

Patch-clamp Experimente
am mutierten spannungsabhängigen Natriumkanal
aus dem Rattenhirn
exprimiert in Oozyten von
Xenopus laevis

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Xiaodong Wang
aus
Shanghai

1989

Patch-clamp Experimente
am mutierten spannungsabhängigen Natriumkanal
aus dem Rattenhirn
exprimiert in Oozyten von
Xenopus laevis

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Xiaodong Wang
aus
Shanghai

1989

Patch-Clamp Experimente
an spannungsgesteuerten Ionenkanälen
aus dem Kollodium
experiment in Oxyden von
Kernstein

Thema
zum Vergleich des Ertrags eines
Kollodiums des Kollodiums
des Kollodiums des Kollodiums
an der Kollodiums des Kollodiums

Referent: Prof. Dr. G. Boheim

Korreferent: Prof. Dr. O. Pongs

Tag der mündlichen Prüfung:

1. Juni 1989

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	1
Einleitung	
2	3
Der spannungsabhängige Na⁺-Kanal	
2.1	3
Das Hodgkin-Huxley-Modell	
2.1.1	5
Die Aktivierung des Na ⁺ -Kanals	
2.1.2	5
Die steady-state Inaktivierung	
2.1.3	7
Der gating-Mechanismus	
2.1.4	11
Blockade und Modifikation durch Pharmaka und Neurotoxine	
2.2	12
Die Struktur des Na⁺-Kanals	
2.2.1	13
Die Primärsequenz des Proteins	
2.2.2	13
Die Sekundärstruktur des Kanalproteins	
3	15
Experimentelle Methoden	
3.1	15
Die patch-clamp-Technik	
3.1.1	15
Das Meßprinzip	
3.1.2	17
Die experimentelle Anordnung	
3.1.2.1	17
Die Meßlösungen	
3.1.2.2	18
Die Meßapparatur	
3.1.2.3	18
Die Elektrode	
3.1.2.4	19
Der Verstärker	
3.1.2.5	21
Pulskontrolle mit einem Computer	
3.2	22
Mutagenese des Na⁺-Kanals aus Rattenhirn	
3.2.1	22
Die Klonierung der cDNA	
3.2.2	22
Mutagenese an der cDNA	
3.3	23
Expression des Na⁺-Kanals in <i>Xenopus</i> Oozyten	
3.3.1	24
Präparation der Oozyten	
3.3.2	24
Behandlung der mRNA	
3.3.3	25
Injizieren der mRNA in die Oozyten	
3.3.4	25
Kultivieren der Oozyten	
4	27
Die Registrier- und Auswerteverfahren	
4.1	27
Das P/4-Verfahren	

4.2	Auswertung der makroskopischen Ströme	28
4.2.1	Pulsprotokolle und Auswertung der Aktivierungskurven	29
4.2.2	Pulsprotokolle und Auswertung für die steady-state-Inaktivierung	34
4.3	Einzelkanalmessung	37
4.4	Die Rauschanalyse	39
4.4.1	Theoretische Grundlagen	39
4.4.2	Auswerteprogramm	41
5	Meßergebnisse	44
5.1	Messungen am nativen Na⁺-Kanal	44
5.1.1	Aktivierung	44
5.1.2	Inaktivierung	49
5.1.3	Einzelkanalmessung	51
5.1.4	Rauschanalyse	54
5.2	Messungen an Mutanten mit Punktmutation in S4	55
5.2.1	Zusammenfassung aller gemessenen Mutanten	56
5.2.2	Effekte an der Aktivierungskurve	58
5.2.3	Vergleich der formalen gating-Ladungen	64
5.2.4	Additive Effekte bei verschiedenen Domänen	65
5.2.5	Vielkanalfluktuationsanalyse	67
5.3	Messungen der Deletionsmutanten	68
5.3.1	Tabelle der Mutanten	68
5.3.2	Inaktivierungseffekte der cZ-Mutante	71
5.3.3	Einzelkanalmessung der cZ-Mutante	76
5.3.4	Die Mutanten mit Deletionen zwischen anderen Domänen	78
5.3.5	Vielkanalfluktuationsanalyse	80
6	Diskussion der Ergebnissen	81
6.1	Punktmutationen in den S4-Segmenten	81
6.1.1	Wirkung auf den Aktivierungsprozeß	81
6.1.2	Orientierung der S4-Segmente	82
6.1.3	Die Äquivalenz der vier Domänen	83
6.1.4	Die Einzelkanalleitwerte	84
6.2	Die Deletionsmutanten	84
6.2.1	Wirkung auf die Inaktivierung der cZ-Mutante	84

6.2.2	Mutanten mit Deletion zwischen anderen Domänen	85
6.2.3	Die Einzelkanalleitwerte	86
6.3	Über das Hodgkin-Huxley-Modell	86
6.4	Schlußfolgerung und Ausblick	87
7.	Zusammenfassung	88
	Literaturverzeichnis	90
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

Eine wichtige Funktion von biologischen Membranen ist die Kompartimentierung des Organismus in Einzelzellen. Dies ermöglicht die Differenzierung von Zellen mit unterschiedlichen Funktionen und Strukturen. Aber um die physiologische Funktion des gesamten Organismus zu koordinieren, muß jede Zelle ständig mit ihrer Umgebung und anderen Zellen Informationen austauschen. Dazu werden unter anderem die sogenannten Ionenkanäle benutzt. Ionenkanäle sind besonders geeignet, eine schnelle Signalübertragung zu ermöglichen.

Die Forschung der letzten zwei Jahrzehnte hat gezeigt, daß in fast allen untersuchten Zellen Ionenkanäle existieren. Die spannungsabhängigen Natrium- und Kalium-Kanäle sind wohl die bekanntesten Ionenkanäle. Sie bilden die Grundlage für die Entstehung des Aktionspotentials und damit für die Signalvermittlung zwischen den Nervenzellen (Hodgkin und Huxley, 1952a; Agnew, 1984; Catterall, 1984).

Die ersten bahnbrechenden Untersuchungen wurden in den fünfziger Jahren von Hodgkin und Huxley in England durchgeführt. Am Riesenaxon des Tintenfisches konnten Hodgkin und Huxley nachweisen, daß das Aktionspotential vom Na^+ -Strom und K^+ -Strom getragen wird. Aufgrund separater Blockierung des Na^+ -Stroms bzw. K^+ -Stroms durch verschiedene Neurotoxine nimmt man an, daß unterschiedliche Kanäle für Na^+ -Ionen bzw. K^+ -Ionen existieren. Hodgkin und Huxley konnten aus ihren Experimenten ein quantitatives Modell für den spannungsabhängigen Na^+ -Kanal bzw. K^+ -Kanal konstruieren.

In der Folgezeit wurden weitere Untersuchungen an verschiedenen Na^+ , K^+ -Systemen durchgeführt. Die Ergebnisse konnten durch das Hodgkin-Huxley-Modell sehr gut beschrieben werden.

Mit Beginn der achtziger Jahre führte die Molekularbiologie zu neuen Erkenntnissen über Ionenkanäle. Mit Hilfe moderner Sequenzierungstechniken hat man die Aminosäuresequenzen verschiedener Ionenkanäle bestimmt und Strukturvorstellungen für diese integralen

Membranproteine entwickelt. Mit der rekombinanten DNA-Technik konnte man den Na^+ -Kanal klonieren. Man ist jetzt in der Lage, künstlich Änderungen in der Nukleotidsequenz durchzuführen. In einem geeigneten Expressionssystem kann der mutierte Kanal dann elektrophysiologisch untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden patch-clamp-Untersuchungen am mutierten Na^+ -Kanal durchgeführt. Der spannungsabhängige Na^+ -Kanal aus dem Rattenhirn (Typ II) wurde durch Punktmutation (Austausch einzelner Aminosäuren) bzw. Deletionsmutation (Ausschneiden von verschiedenen Stücken der Aminosäuresequenz) künstlich verändert. Danach wurde die in-vitro transkribierte mRNA in die Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* injiziert. Nach der erfolgreichen Expression der Proteine in der Zellmembran wurden patch-clamp-Messungen durchgeführt. Aus den unterschiedlichen Charakteristika des normalen Na^+ -Kanals und des mutierten Kanals hoffte man, mögliche Relationen zwischen den Strukturen des Proteins und der Funktion des Kanals erkennen zu können.

2 Der spannungsabhängige Na⁺-Kanal

In den Nervenzellen werden die spannungsgesteuerten Na⁺ - (bzw. K⁺-) Kanäle dazu benutzt, um Erregbarkeiterscheinungen zu übertragen. Im Ruhezustand besitzt die Nervenzelle ein Ruhepotential von ca. -60mV, was hauptsächlich durch das K⁺-Gleichgewichtspotential bestimmt wird. Bei der Erregung (Depolarisation) werden die Na⁺-Kanäle angeschaltet, was zu einem Na⁺-Einstrom führt und das Membranpotential zum Na⁺-Gleichgewichtspotential hin umlädt. Durch die Inaktivierung des Na⁺-Kanals und das zusätzliche Anschalten der spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle (K⁺-Ausstrom) wird das Membranpotential jedoch wieder auf den Ruhewert repolarisiert. So entsteht das Aktionspotential und der Nervenimpuls breitet sich längs der Nervenfaser aus.

2.1 Das Hodgkin-Huxley-Modell

Hodgkin und Huxley konnten aus ihren voltage-clamp-Experimenten am Riesenaxon des Tintenfisches eine empirische Formulierung für das Aktionspotential angeben (Hodgkin et al., 1952; Hodgkin und Huxley, 1952a-d). Danach wird der Strom I_M , der durch die Zellmembran fließt, vom Na⁺-Einstrom I_{Na} , dem K⁺-Ausstrom I_K und einem Leckstrom I_L getragen.

$$I_M = I_{Na} + I_K + I_L \quad (2.1)$$

$$I_{Na} = g_{Na} \cdot (E - E_{Na}) \quad (2.2)$$

$$I_K = g_K \cdot (E - E_K) \quad (2.3)$$

$$I_L = g_L \cdot (E - E_L) \quad (2.4)$$

Dabei ist E das Membranpotential und E_{Na} bzw. E_K das Gleichgewichtspotential für Na⁺ bzw. K⁺. g_L und E_L sind Konstanten des Leckstroms, der hauptsächlich die Leitfähigkeit für Cl⁻ beschreibt und vom Zustand der Membran bestimmt wird.



g_{Na} und g_K beschreiben die Zeit- und Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit des Na^+ - bzw. K^+ -Kanals. Von nun an werden wir nur den Na^+ -Kanal betrachten.

Für den Na^+ -Strom beobachtet man zwei Vorgänge nach der Depolarisation, nämlich die Aktivierung und die Inaktivierung. Hodgkin und Huxley wählten folgende Formulierung:

$$\bar{g}_{Na} = m^3 h \bar{g}_{Na} \quad , \quad (2.5)$$

wobei $\bar{g}_{Na}$ die Maximalleitfähigkeit ist und die Variablen m und h die folgenden Differentialgleichungen erfüllen:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1-m) - \beta_m m \quad (2.6)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1-h) - \beta_h h \quad . \quad (2.7)$$

Dabei sind die Parameter α_m , β_m und α_h , β_h vom Membranpotential abhängig, aber nicht von der Zeit.

Die Lösungen unter Berücksichtigung der Anfangsbedingungen $m(t=0) = m_0$ und $h(t=0) = h_0$ lauten:

$$m = m_\infty - (m_\infty - m_0) \cdot \exp(-t/\tau_m) \quad (2.8)$$

$$h = h_\infty - (h_\infty - h_0) \cdot \exp(-t/\tau_h) \quad (2.9)$$

mit $m_\infty = \alpha_m / (\alpha_m + \beta_m)$ und $\tau_m = 1 / (\alpha_m + \beta_m)$ (2.10, 2.11)

$h_\infty = \alpha_h / (\alpha_h + \beta_h)$ und $\tau_h = 1 / (\alpha_h + \beta_h)$. (2.12, 2.13)

Es wird angenommen, daß zur Zeit $t=0$ die Na^+ -Leitfähigkeit sehr klein ist. Dann kann man $m_0 = 0$ einsetzen. Bei ausreichender Depolarisation wird die Inaktivierung für $t \rightarrow \infty$ vollständig sein, so daß man h_∞ vernachlässigen kann ($h_\infty = 0$). Die Formel für die Na^+ -Leitfähigkeit lautet dann:

$$g_{\text{Na}} = g'_{\text{Na}} \cdot [1 - \exp(-t/\tau_m)]^3 \cdot \exp(-t/\tau_h) \quad (2.14)$$

wobei $g'_{\text{Na}} = m_\infty^3(V) \cdot h_0 \cdot \bar{g}_{\text{Na}}$.

2.1.1 Die Aktivierung des Na^+ -Kanals

Die Variable m beschreibt die Aktivierung des Na^+ -Kanals. In Bild 1 werden die Funktionen $m_\infty(V)$ und $\tau_m(V)$ graphisch dargestellt.

Das Potential, bei dem $m_\infty(V)=1/2$ gilt, wird mit V_m bezeichnet. Die Steigung der m_∞ -Kurve beim Potential V_m wird als z_m bezeichnet. Durch V_m und z_m bei der m_∞ -Kurve wird der Aktivierungsprozeß der Na^+ -Kanäle charakterisiert.

2.1.2 Die steady-state-Inaktivierung

Die Variable h beschreibt das Schließen des Na^+ -Kanals. In Bild 2 werden τ_h und die steady-state-Inaktivierung h_∞ graphisch dargestellt. V_h gibt an, bei welchem Potential 50% der Na^+ -Kanäle bereits inaktiviert sind.

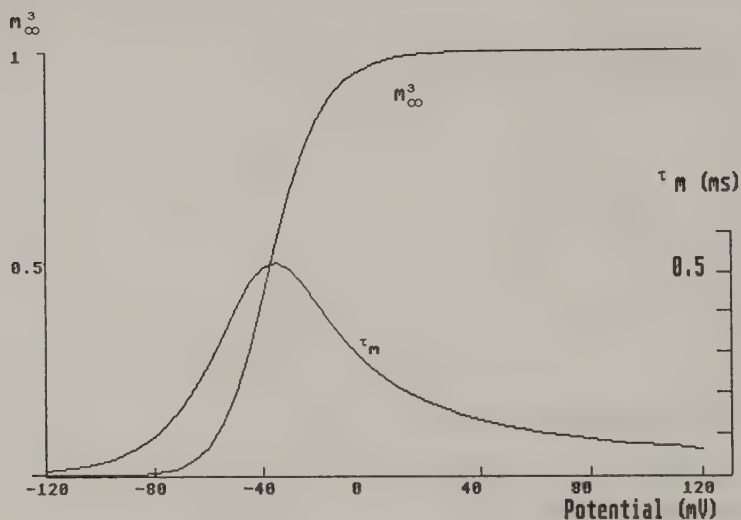


Bild 1 m_{∞}^3 und τ_m für das Tintenfisch-Axon

Nach Hodgkin und Huxley (1952d). Die Formeln für die Parameter lauten:

$$m_{\infty} = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m}, \quad \tau_m = \frac{1}{\alpha_m + \beta_m} \quad \text{mit}$$

$$\alpha_m = 0.1 \cdot (V + 25) / \left(\exp \frac{V + 25}{10} - 1 \right)$$

$$\text{und} \quad \beta_m = 4 \cdot \exp(V / 18)$$

wobei V das Membranpotential in mV ist.

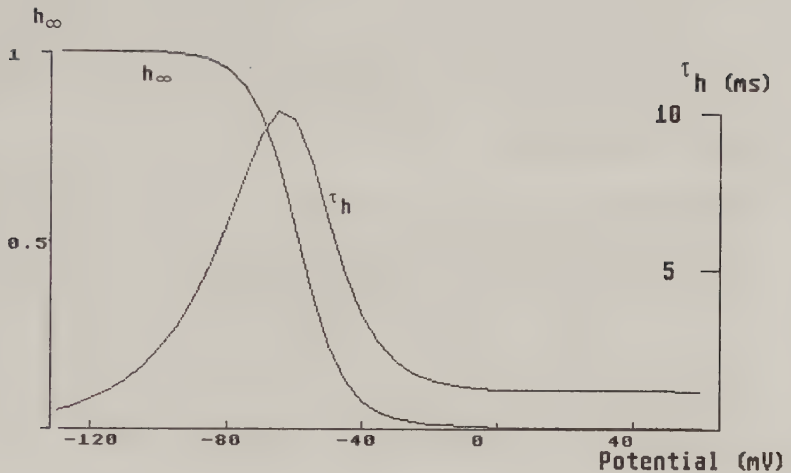


Bild 2 h_{∞} und τ_h für das Tintenfisch-Axon

Nach Hodgkin und Huxley (1952b):

$$h_{\infty} = \frac{\alpha_h}{\alpha_h + \beta_h} \quad , \quad \tau_h = \frac{1}{\alpha_h + \beta_h} \quad \text{mit}$$

$$\alpha_h = 0.07 \exp(V/20)$$

$$\beta_h = 1 / \left(\exp \frac{V+30}{10} + 1 \right) \quad ,$$

wobei V das Membranpotential in mV ist.

2.1.3 Der gating-Mechanismus

Der obige Formalismus bekommt einen physikalischen Sinn, wenn man annimmt, daß m und h die Bewegungen zweier sogenannter "gates" in dem Kanal beschreiben. Es wird angenommen, daß in dem Kanal solche

Tore existieren, die sich unter elektrischer Spannung zwischen offenen und geschlossenen Zuständen bewegen können. Nur wenn das Tor für die Aktivierung und das für die Inaktivierung offen sind, diffundieren die Na^+ -Ionen längs ihres elektrochemischen Gradienten durch den Na^+ -Kanal. Diese Torbewegungen werden als "gating" (Schalten) des Kanals bezeichnet.

Die Struktur des Tores muß, da sein Offenzustand spannungsabhängig ist, elektrische Ladungen beinhalten. Hodgkin und Huxley bestimmten in ihren Experimenten formal die Anzahl der Ladungen, die benötigt werden, um einen Ionenkanal zu öffnen. In ihrem Modell (Hodgkin und Huxley, 1952d) wurde angenommen, daß für ausreichend negative Spannungen, wobei wegen $h \approx 1$ die Inaktivierung vernachlässigbar ist, die Na^+ -Leitfähigkeit proportional zu dem Anteil positiver gating-Ladungen in der Nähe der Innenseite der Membran ist:

$$g_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} P_i, \quad P_i + P_o = 1, \quad (2.15, 2.16)$$

wobei P_i der Anteil der gating-Ladungen an der Innenseite und P_o der an der Außenseite ist. Wenn diese Ladungen sich voneinander unabhängig frei bewegen können, folgen sie der Boltzmann'schen Verteilung:

$$P_i / P_o = \exp \left[(W + zeV) / kT \right]. \quad (2.17)$$

Dabei ist W die Arbeit für eine Ladung, die von innen nach außen die Membran durchquert, unter der Bedingung $V=0$ und $kT/e=25\text{mV}$ (20°C).

Der Ausdruck für P_i lautet dann:

$$P_i = \frac{\exp[(W+zeV)/kT]}{1+\exp[(W+zeV)/kT]} \quad (2.18)$$

Damit ergibt sich für g_{Na} :

$$\begin{aligned} g_{Na} &= \bar{g}_{Na} \cdot \frac{\exp[(W+zeV)/kT]}{1+\exp[(W+zeV)/kT]} \\ &= \bar{g}_{Na} \cdot \frac{1}{1+\exp[-(W+zeV)/kT]} \quad (2.19) \end{aligned}$$

Für große negative V ist $\exp[(W+zeV)/kT] \ll 1$; daraus folgt:

$$g_{Na} \approx \bar{g}_{Na} \cdot \exp[zeV/kT] = \bar{g}_{Na} \cdot \exp(zV/25) \quad (2.20)$$

Hodgkin und Huxley haben gefunden, daß für negative Spannungen

$$g_{Na} \sim \exp(V/4) \quad (2.21)$$

gilt. Damit beträgt die Anzahl der formalen gating-Ladungen für den Aktivierungsprozeß $z_m \approx 6$. Das heißt, sechs Ladungen müssen die Membran überqueren, um einen Na^+ -Kanal zu öffnen, oder ein Dipol mit drei Ladungen auf beiden Seiten dreht seine Polarisationsrichtung um (Keynes, 1983). Diese Bewegung der Ladungen wird gating-Strom genannt.

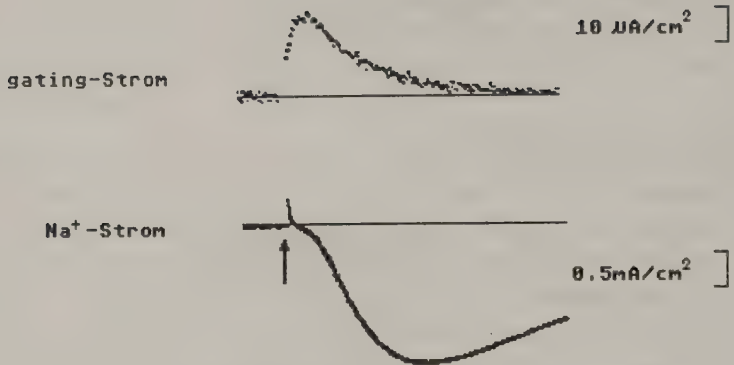


Bild 3 Gating-Strom des Tintenfisch-Axons

Nach Armstrong und Bezanilla (1973):
Haltepotential $-70 mV$, Testpotential $70 mV$.

In den siebziger Jahren wurden wirklich solche Ströme gemessen (Armstrong und Bezanilla, 1973, 1974; Keynes und Rojas, 1973, 1974). In Bild 3 wird ein Beispiel für einen gating-Strom am Tintenfisch-Axon gezeigt.

Die obigen Überlegungen können auch auf den Inaktivierungsprozeß angewendet werden. Damit können analog zu z_m auch formale gating-Ladungen z_h für die Inaktivierung definiert werden.

2.1.4 Blockade und Modifikation durch Pharmaka und Neurotoxine

Hodgkin und Huxley mußten die Ionen in der Badlösung austauschen, um zu zeigen, daß der Gesamtstrom während des Aktionspotentials aus Na^+ - und K^+ -Teilströmen besteht (Hodgkin et al., 1952). In den sechziger Jahren wurde dann das Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) erstmalig benutzt, um den Na^+ -Teilstrom zu blockieren (Narahashi et al., 1964). Gleich darauf wurde auch Saxitoxin (STX) entdeckt, das eine gleichartige Wirkung auf den Na^+ -Strom besitzt wie TTX (Nakamura et al., 1965). Diese spezifischen Neurotoxine werden an den Rezeptoren, die an der extrazellulären Seite des Membranproteins sitzen, gebunden und verhindern dadurch die Passage der Ionen durch die Kanäle. Schon mit einer Konzentration im nM-Bereich wird der Na^+ -Strom blockiert. Für den K^+ -Strom wurde auch ein spezieller Blocker gefunden, nämlich das Tetraethylammonium (TEA). Der Rezeptor für TEA liegt mitten im Kanal und für eine ausreichende Blockade wird eine Konzentration im mM-Bereich benötigt (Hagiwara und Saito, 1959; Hille, 1967). Mit Hilfe solcher spezifischer Blocker ist man heute in der Lage, die verschiedenen Ionenströme leicht voneinander zu trennen (Kao und Nishiyama, 1965; Catterall, 1980).

Neben den Blockern existieren noch andere Klassen von chemischen Substanzen, die den Kanal zwar nicht blockieren, aber dessen Eigenschaften beeinflussen (Ulbricht, 1969; Schmidt und Schmidt, 1974). Es wurden vor allem Substanzen gefunden, die von der intrazellulären Seite aus die Inaktivierung des Na^+ -Kanals modifizieren (Armstrong et al., 1973).

2.2 Die Struktur des Na⁺-Kanals

Durch die neueren Entwicklungen der biochemischen und molekularbiologischen Techniken ist man erst seit wenigen Jahren in der Lage, das Membranprotein zu reinigen und dessen DNA zu klonieren. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, durch die Verbindung dieser Techniken mit elektrophysiologischen Methoden die direkte Beziehung zwischen den Funktionen des Kanals und dessen molekularer Struktur zu erforschen.

Durch Experimente mit Neurotoxinen als spezifischer molekularer Probe wurde ein glykosyliertes Polypeptid von 260kD als die Hauptkomponente des Na⁺-Kanals im elektrischen Aal (Miller et al., 1983) und im Säugerhirn (Hartshorne und Catterall, 1984) identifiziert. Außerdem wurden auch der Na⁺-Kanal vom Säugetier-Skelettmuskel (Casadei et al., 1984) und vom Herzmuskel des Huhns (Lombet und Lazdunski, 1984) isoliert. Eine Teilsequenz des Na⁺-Kanals in *Drosophila* wurde bestimmt (Salkoff et al., 1987). Es läßt sich vermuten, daß alle Na⁺-Kanäle in verschiedenen Vertebratenspezies und Geweben ähnliche Strukturen besitzen. Im Gegensatz zum elektrischen Aal und zum Herzmuskel des Huhns besitzt der Na⁺-Kanal aus Hirn und Skelettmuskel der Säugetiere außer der Hauptkomponente noch zwei kleinere Untereinheiten (Hirn: 39kD und 37kD, Skelettmuskel: 45kD und 38kD).

Man hat die oben isolierten Proteine mit der Rekonstitutionsmethode in Phospholipidvesikeln (Talvenheimo et al., 1982; Weigele und Barchi, 1982; Rosenberg et al., 1984a; Tamkun et al., 1984) bzw. planaren Lipidmembranen (Hanke et al., 1984; Hartshorne et al., 1985; Keller et al., 1986) getestet. Es wurde ein Na⁺-Flux beobachtet, der durch Veratridin oder Batrachotoxin (BTX) aktiviert und durch TTX blockiert wurde, und zwar mit der gleichen Charakteristik wie beim nativen Na⁺-Kanal. Es wurden auch Einzelkanalströme gemessen (Rosenberg et al., 1984b). Die Ergebnisse sind ein starkes Indiz dafür, daß das glykosylierte 260kD-Protein die meisten physiologischen Funktionen des Na⁺-Kanals hervorbringen kann (Catterall, 1982; Goldin et al., 1986).

2.2.1 Die Primärsequenz des Proteins

Numa und Mitarbeitern gelang es, sowohl die cDNA des Na⁺-Kanalproteins aus Rattenhirn als auch die aus dem elektrischen Organ des elektrischen Aals zu klonieren (Noda et al., 1984, 1986; Kayano et al., 1988). Die komplette Sequenz des Na⁺-Kanals (Typ II) aus Rattenhirn besteht aus 4998 Nukleotidbasenpaare.

Die Aminosäuresequenzen der Na⁺-Kanäle aus Rattenhirn und elektrischem Aal zeigen eine Homologie von 62%. Es fällt bei den Sequenzen auf, daß jedes der Proteine vier homologe Domänen von je etwa 300 Aminosäuren besitzt. Die vier Domänen von Ratte und Aal zeigen hohe Homologie untereinander. Gleiches zeigt auch der Bereich zwischen Domäne III und Domäne IV. Die Bereiche zwischen Domäne I/II bzw. II/III weisen jedoch keine signifikante Homologie auf.

Jede der vier Domänen weist 5 hydrophobe Segmente (S1, S2, S3, S5 und S6) und das Segment S4 auf, bei dem sich an jeder dritten Stelle eine positiv geladene Aminosäure befindet.

2.2.2 Die Sekundärstruktur des Kanalproteins

Numa et al. stellten die Hypothese auf, daß die vier homologen Domänen in symmetrischer Weise die Membran überspannen. In Bild 4 wird das Modell gezeigt. Das Segment S4 ist als ein elektrischer Dipol gedacht, dessen Konformationsänderung die Ursache für den gating-Strom sein könnte. Wegen der Selektivität für Kationen (Na⁺) kann das S4-Segment nicht die innere Kanalwand bilden. Die Wechselwirkungen zwischen den positiven Ladungen im S4-Segment und den negativen Ladungen der anderen Segmente könnten die Struktur des Proteins stabilisieren (Noda et al., 1986).

Neben dem Modell von Numa wurden noch andere Modelle vorgeschlagen (Greenblatt et al., 1985; Guy und Seetharamulu, 1986). Bezüglich der Transmembransegmente sind sie sich jedoch im wesentlichen ähnlich, insbesondere herrscht über die Funktion des S4-Segmentes Einigkeit. In dieser Arbeit werden die Bezeichnungen von

Numa durchgehend benutzt.

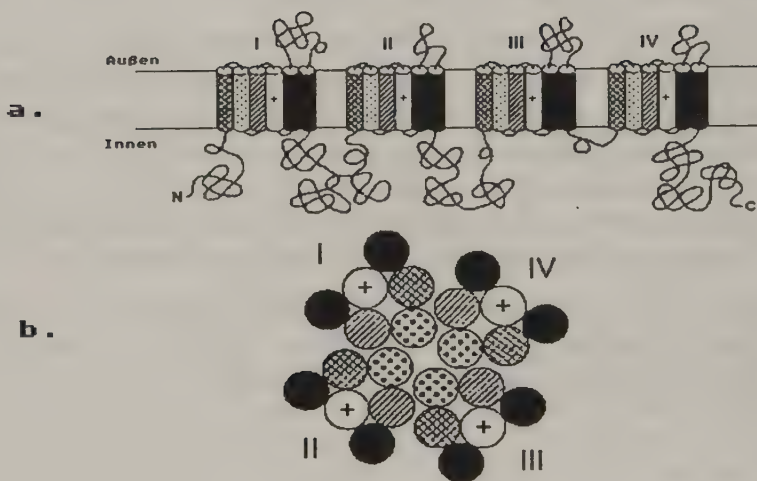


Bild 4 Das Natrium-Kanal-Modell von Numa

Im oberen Bild werden die Transmembran-Segmente gezeigt, im unteren der Querschnitt dazu. Die gleichen Segmente sind mit gleichen Mustern dargestellt. Die S4-Segmente sind mit Pluszeichen versehen.

3 Experimentelle Methoden

In diesem Kapitel werden die experimentellen Methoden zur Untersuchung des in *Xenopus* Oozyten exprimierten Na⁺-Kanals beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen Experimente am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt. Die Mutagenese am Na⁺-Kanalprotein wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. S. Numa in Kyoto, Japan, vorgenommen.

3.1 Die patch-clamp-Technik

3.1.1 Das Meßprinzip

Die Ströme, die durch einen einzelnen Ionenkanal fließen, liegen meistens im pA-Bereich. Im allgemeinen liegen die zu messenden Ströme in der Größenordnung des Stromrauschens, das aus der thermischen Schwankung des Membranwiderstandes, dem Eigenrauschen des Verstärkers und der Elektroden, sowie anderen Rauschquellen entsteht (Neher 1974). Bei einem voltage-clamp-Experiment beträgt die mittlere quadratische Amplitude des Rauschens

$$\sigma_I^2 = \frac{4 k T}{R} \cdot B \quad (3.1)$$

wobei B die Bandbreite des Verstärkers und R den Meßwiderstand, welcher aus dem Membranwiderstand, dem Elektrodenwiderstand und dem Meßgerätewiderstand besteht, bezeichnen. k ist die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur.

Die von Neher und Sakmann eingeführte patch-clamp-Methode ermöglicht es, das Rauschen weitgehend zu reduzieren (Neher und Sakmann, 1976; Sakmann und Neher, 1984). Bei der Methode wird

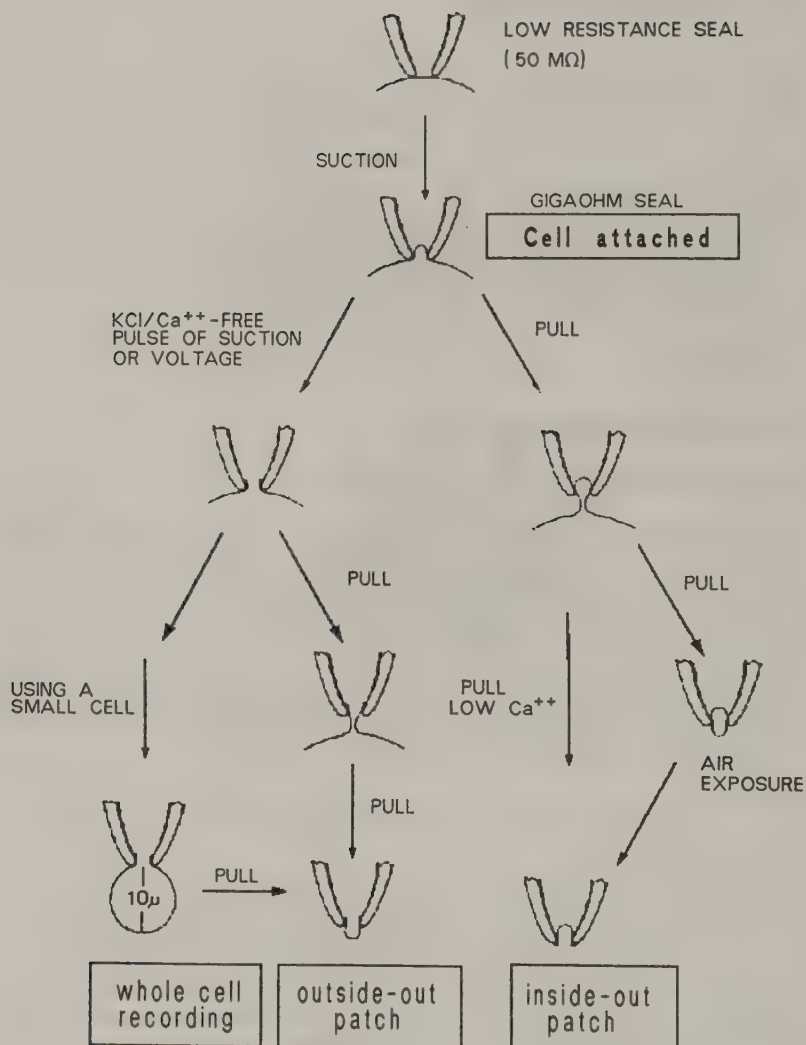


Bild 5 Die Variationen der patch-clamp-Technik

(Nach Hamill et al., 1981)

eine hitzepolierte Glasmikropipette auf die Zellmembran aufgesetzt, wodurch die Meßfläche der Membran auf die kleine Fläche (patch) unter der Glaspipette reduziert wird. Durch einen leichten Unterdruck saugt sich die Membran an der Glaswandung fest, so daß der Abdichtwiderstand zwischen der Glasoberfläche und der Zellmembran auf einige $10\text{ G}\Omega$ steigt (giga seal). Dadurch wird der gesamte Meßwiderstand, der von der Fläche der Membran unter der Elektrode abhängt, auf einige $\text{G}\Omega$ erhöht (Hamill et al., 1981).

Das sich so ergebende Rauschen ist dann nach obiger Formel etwa um den Faktor 100 geringer als bei einer Ganzzelleableitung, so daß die Messung des Stroms durch einen Einzelkanal ermöglicht wird (Horn und Patlak, 1980; Sigworth und Neher, 1980; Hamill und Sakmann, 1981; Sakmann und Neher, 1983).

Ein anderer Vorteil bei der giga-seal-Technik liegt darin, daß man die Ableitkonfiguration manipulieren kann. Der Kontakt zwischen dem Glas und der Zellmembran erweist sich als mechanisch ziemlich stabil. Durch eine geeignete Vorgehensweise kann man zum Beispiel wahlweise die Innen- oder Außenseite der Zellmembran zur Badlösung richten (Bild 5; Hamill et al., 1981).

3.1.2 Die experimentelle Anordnung

3.1.2.1 Die Meßlösungen

Zuerst werden in der Tabelle 1 alle für das Experiment benötigten Lösungen in ihren Kompositionen angegeben. Dabei sind im ersten Teil die Pipettenlösungen aufgeführt. Im zweiten Teil sind die Lösungen für die Behandlung der Oozyten zu sehen, die im späteren Teil dieses Kapitels noch näher beschrieben wird.

Tabelle 1 Die Meßlösungen

Lösung	Komposition (mM)
für die Potentialelektrode	KCl 3000
für die Stromelektrode	K ₂ SO ₄ 500, KCl 500
für die patch-Elektrode	NFR
Normal Frog Ringer-Lösung (NFR)	NaCl 115, KCl 2.5, CaCl ₂ 1.8 HEPES 10, pH 7.2, 240 mOsm
zur Behandlung der Oozyten:	
Barth-Lösung	NaCl 88, KCl 1, MgSO ₄ 0.82, Ca(NO ₃) ₂ 0.41, NaHCO ₃ 2.4, Tris/HCl 5, pH 7.4, 200 mOsm
Hypertone Lösung	K ⁺ -aspartat 200, KCl 20, MgCl ₂ 1, EGTA 10, HEPES 10, pH 7.4, 475 mOsm

3.1.2.2 Die Meßapparatur

Die Meßapparatur wird auf einen erschütterungsfreien Tisch mit vier luftgefüllten Gummipuffern gestellt. Ein Mikroskop dient zur Beobachtung beim Annähern der Elektrode. Die genaue Positionierung der patch- und der intrazellulären Elektroden wird jeweils durch einen dreiachsigen Mikromanipulator gesteuert. Die Kulturschale für die Zelle wird auf der Arbeitsbühne des Mikroskops befestigt. Die Apparatur befindet sich in einem Faradayschen Käfig, um sie vor Rauscheinstreuungen von Außen, wie z.B. Netzbrummen, abzuschirmen.

3.1.2.3 Die Elektroden

Es werden mehrere Elektroden im Versuch benutzt:

- 1) Zwei Elektroden befinden sich in der Badlösung (NFR): Eine Masseelektrode zur Erdung und eine andere als Potentialreferenzelektrode.
- 2) Die mit normaler Froschringerlösung (NFR) gefüllte patch-Pipette befindet sich in einem Pipettenhalter. Der Pipettenhalter besteht aus einer Abschirmvorrichtung mit BNC-Stecker, an dem ein chlorierter Silberdraht angelötet ist. Der Pipettenwiderstand wird zwischen 5~10M Ω für makroskopische Ströme und bis zu 20M Ω für Einzelkanalmessungen gewählt.
- 3) Die intrazelluläre Potentialelektrode wird mit 3M KCl-Lösung gefüllt. Sie wird in die Oozyten gestochen und dient zur Messung des intrazellulären Potentials. Zusammen mit der Referenzelektrode im Bad (als Nullpunkt definiert) bestimmt man das Membranpotential. Die Potentialelektrode befindet sich ebenfalls in einem Pipettenhalter.
- 4) Manchmal wird noch eine Stromelektrode für voltage-clamp-Experimente benutzt. Die Elektrode wird zur Abschirmung zusätzlich mit Leitsilber bestrichen, und die Abschirmungsschicht wird mit der Erde verbunden. Dies dient zur Vermeidung einer kapazitiven Kopplung mit den anderen Elektroden. Diese Maßnahme ist für die Stromelektrode erforderlich, weil große Ströme fließen und dadurch Störungen durch Elektrodenkopplung auftreten.

3.1.2.4 Der Verstärker

Als Meßeinheit wird ein Gerät des Typs EPC-7 benutzt. Es besteht aus dem Meßverstärker (head-stage) und der Steuereinheit. Die head-stage enthält einen hochempfindlichen Operationsverstärker und dient als Strom-Spannungs-Wandler. Der Meßverstärker wird direkt an den Pipettenhalter montiert, um durch die Verbindungskabel verursachtes Rauschen möglichst klein zu halten.

Mit der Steuereinheit des EPC-7 werden die Verfahren zur Optimierung des Signal-Rauschverhältnisses wie Kapazitätskompensation,

Nullpotentialabgleich usw. durchgeführt. Sie besitzt zwei Bessel-filter von 3kHz und 10kHz (Sigworth: EPC-7 User Manual).

In Bild 6 werden die Hauptkomponenten der Meßanordnung gezeigt. Die Signale aus dem Verstärker werden über einen weiteren Bessel-filter gleichzeitig auf dem Oszilloskop gezeigt und von einem Computer aufgenommen.

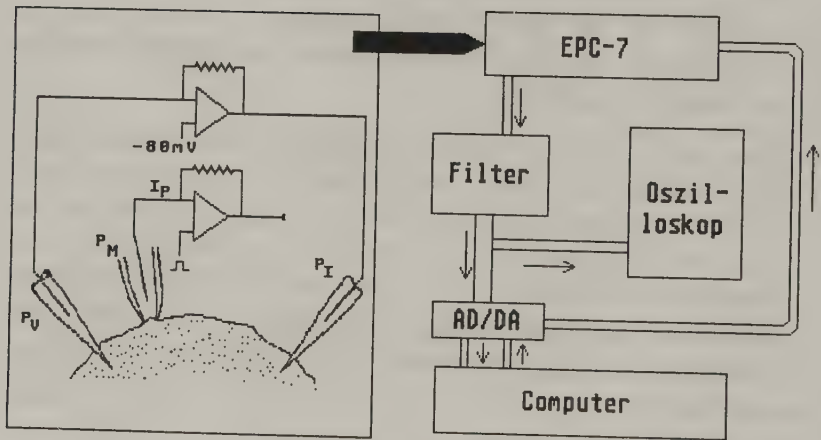


Bild 6 Meßapparatur

- P_V : Pipette zur Messung des intrazellulären Potentials.
- P_M : Patch-Pipette
- P_I : Strompipette
- I_P : Ionenstrom

3.1.2.5 Pulskontrolle mit einem Computer

Es wird ein PDP 11/73 Computer benutzt, um die Stimulationspulse zu erzeugen und die Daten zu registrieren. Hierbei wird ein in Göttingen entwickelter A/D, D/A-Wandler mit je 8 Input- und Output-Kanälen verwendet. Mit diesen Eingängen werden gleichzeitig alle nötigen Daten wie Strom, Membranpotential, Temperatur der Badlösung usw. aufgenommen.

Verschiedene Pulsprotokolle, die zur Stimulation nötig sind, werden als Dateien im Rechner abgelegt. Im Stimulationsprogramm kann man auch während des Experiments die Parameter für den einzelnen Puls, wie z.B. Dauer und Amplitude des Pulses, die Wartezeit zwischen den Pulsen, Anzahl der Pulse für Mehrpulseexperimente usw. variieren.

3.2 Mutagenese des Na⁺-Kanals aus Rattenhirn

Es gelang der Arbeitsgruppe von Numa, Kyoto, Japan, die Na⁺-Kanalproteine aus dem elektrischen Organ des elektrischen Aals und dem Gehirn der Ratte zu klonieren. Damit wurde ein neuer Weg eröffnet, die molekularen Mechanismen des Schaltens eines Ionenkanals zu erforschen.

3.2.1 Die Klonierung der cDNA

Aus dem Gehirn männlicher Wistar-Ratten wurde Poly(A)-mRNA isoliert. Daraus wurde cDNA hergestellt. Die genaue Beschreibung der Klonierung ist im Originalartikel aufgeführt (Noda et al., 1986). Es stellte sich heraus, daß im Rattenhirn 3 verschiedene Na⁺-Kanäle existieren, die mit Typ I, II und III bezeichnet wurden. Na⁺-Kanal Typ III wurde in einer anderen Arbeit untersucht (Suzuki et al., 1988). Der Typ I des Na⁺-Kanals wurde nie erfolgreich exprimiert. In dieser Arbeit wurde deshalb nur der Typ II des Na⁺-Kanals untersucht.

3.2.2 Mutagenese an der cDNA

Um die Punktmutation durchzuführen, wurde aus dem Plasmid pRII-2 ein rekombinierendes Plasmid pRII-2A vorbereitet. Es beinhaltet die Protein kodierende Sequenz der Na⁺-Kanal-II-cDNA aus Rattenhirn verbunden mit dem Bakteriophagenpromotor SP6. In pRII-2A wurden dann einige Endonuclease-Restriktionssites eingefügt, ohne dabei die Aminosäuresequenz des Kanals zu verändern (Bild 7). Die durch in-vitro-Transkription der cDNA synthetisierte mRNA wurde in *Xenopus* Oozyten injiziert. Daraufhin wurden Na⁺-Kanäle in der Membran exprimiert, welche identische funktionale Eigenschaften mit denen haben, die nach Injektion von pRII-2 exprimiert wurden (Stühmer et al., 1987). Deshalb wurden in dieser Arbeit die pRII-2A-Plasmide als Kontrolle für den Wildtyp-Na⁺-Kanal benutzt. Die Punktmutation erfolgt dann durch Substitution

des Nukleotidfragments zwischen den Restriktionssites.

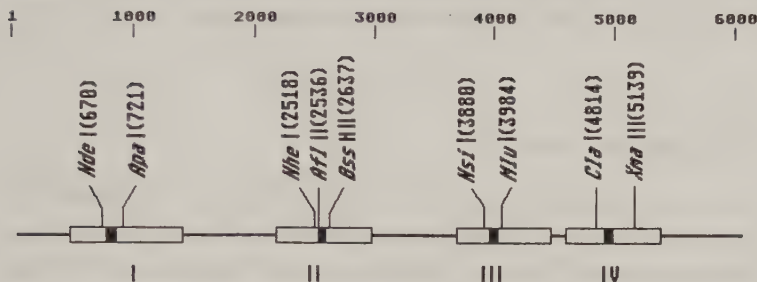


Bild 7 Restriktionssites

Es wurden Deletionsmutationen konstruiert, um die intrazellulären Regionen zwischen den verschiedenen Domänen zu untersuchen. Es wurden zwei Arten von Mutanten gemacht: der Δ -Typ, bei dem ein kleines Stück des Kanalproteins ausgeschnitten oder hinzugefügt wurde, und der c-Typ, bei dem das Protein in zwei Stücke zerlegt wurde. Beim c-Typ wurde ein Gemisch von zwei mRNAs für die entsprechenden Sequenzfragmente injiziert.

Es wurde auch versucht, nur einzelne Domänen zu injizieren. Dies führte jedoch zu keiner erfolgreichen Expression. Anscheinend werden alle vier Domänen benötigt, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden. Im Ergebnisteil wird eine Tabelle für alle erfolgreich exprimierte Deletionsmutanten angegeben.

3.3 Expression des Na^+ -Kanals in *Xenopus*-Oozyten

1981 gelang es Sumikawa et al. (1981), durch Injektion von mRNA aus

dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* in die Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* funktionsfähige ACh-Rezeptorkanäle in der Plasmamembran der Oozyten zu synthetisieren. Seitdem wurden ähnliche Experimente mit anderen mRNAs durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß *Xenopus* Oozyten ein sehr gutes Expressionssystem für fremde mRNA sind (Methfessel et al., 1986).

3.3.1 Präparation der Oozyten

Die Oozyten werden aus dem erwachsenen Frosch herauspräpariert. Die Frösche werden zur Anästhesie vorher für 20 min in Eis gelegt und dann operiert. Es werden die Oozyten der Reifephase V ausgesucht. Die am Bindegewebe anhaftenden Oozyten werden mit einer Irisschere unter dem Mikroskop einzeln abgetrennt. Die Oozyten befinden sich während der weiteren Behandlung in Barth-Lösung (s. Tabelle 1).

3.3.2 Behandlung der mRNA

Die mRNA wird in Äthanol suspendiert, auf Trockeneis von Kyoto nach Göttingen per Luftpost verschickt. Sie wird dann vor der Injektion durch folgendes Verfahren gefällt und in Wasser gelöst:

- 1) Zentrifugation für 10min mit der Ultrazentrifuge (16000U/min).
- 2) Absaugen des Äthanolüberstandes.
- 3) Waschen mit sauberem Äthanol und nochmaliges Zentrifugieren und Absaugen.
- 4) Abtrocknen des restlichen Äthanol unter sterilen Bedingungen.
- 5) Auflösen in bi-destilliertem Wasser in der gewünschten Konzentration .

Die in Wasser gelöste mRNA wird in einer kleinen Plastikkapsel bei

-80°C gelagert. Für die Experimente wird die gelöste mRNA bis zu einem halben Jahr lang weiter benutzt. Um die mRNA von einer Plastikkapsel zu einer anderen zu transferieren, werden die Transferpipetten der Firma Brand (Inhalt 10µl) benutzt. Die Transferpipetten werden zuerst mit einer Lösung aus Äther/Äthanol und dann mit Silikon behandelt und anschließend zwei Stunden bei 150°C hitzebehandelt.

3.3.3 Injizieren der mRNA in die Oozyten

Die in Wasser gelöste mRNA wird mit Hilfe einer Mikropipette mit einer Öffnung von 10-15µm Durchmesser in die Oozyten injiziert. Die Injektionspipetten werden aus Borosilikatglas der Firma Hilgenberg (Ø = 2mm) gezogen. Das Volumen der mRNA-Lösung für eine Injektion beträgt 50nl. Die mRNA-Konzentration für die Kontrollen (normaler Na⁺-Kanal) beträgt 0.3µg/µl. Für Mutanten werden Konzentrationen zwischen 0.3 und 0.6µg/µl gewählt, weil die meisten der Mutanten eine schlechtere Expression zeigen.

3.3.4 Kultivieren der Oozyten

Nach der Mikroinjektion werden die Oozyten in steriler Barth-Lösung in einem Inkubator (Heraeus BK 5060E) bei 19°C aufbewahrt. Die Lösung wird nach Bedarf täglich gewechselt. Der Lösung werden die Antibiotika Penicillin/Streptomycin in 100unit/ml und Gentamicin in 50µg/ml zugegeben.

Zwei Tage nach dem Injizieren wird die Follikelmembran der Oozyten entfernt. Die Oozyten werden dabei eine Stunde lang mit Kollagenase-Lösung (Sigma, St.Louis, MO, USA, Typ II) behandelt und anschließend mit Barth-Lösung gewaschen. Mit zwei feinen Pinzetten wird dann die Follikelmembran mechanisch abgezogen. Die Oozyten werden danach wieder unter denselben Bedingungen bis zum Experiment aufbewahrt.

Die Expression der mRNA für den Na⁺-Kanal in Oozyten erfordert etwa 5-7 Tage. Bis etwa 10 Tage nach dem Injizieren kann der gute Zustand der Oozyten erhalten bleiben.

Kurz vor dem Experiment wird dann die Vitellinmembran der Oocyte entfernt, welche noch die Plasmamembran umgibt. Die Oozyten werden dafür in eine hypertone Lösung (s. Tabelle 1) getaucht. Nach 5-10min schrumpft die Plasmamembran, so daß sich die Vitellinmembran von der Plasmamembran trennt. Die Vitellinmembran wird dann unter einem Mikroskop mechanisch entfernt.

Die Plasmamembran der Oozyten ist nach dem Entfernen der Vitellinmembran mechanisch fragil. Die Oozyten werden deshalb mit großer Vorsicht in ein Schälchen mit Ringerlösung gelegt. Nach einigen Minuten sind sie dann am Boden der Kulturschale festgeklebt, so daß für das weitere Experimentieren keine zusätzliche mechanische Befestigung nötig ist.

4 Die Registrier- und Auswerteverfahren

In diesem Kapitel werden die angewandten Meßverfahren und die Auswertemethoden beschrieben. Um eine rasche Analyse der Daten zu ermöglichen, wurde ein Computer eingesetzt. Die Computerprogramme wurden in einem von Dan Brown, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, entwickeltem Basic für die PDP-11 der Firma Digital Equipment, München, geschrieben. Als Hardware werden ein PDP-11/73-Computer, ein HP-Display und ein HP-Plotter mit 4kB-Speicher benutzt. Die aufgenommenen Stromspuren werden zuerst in einem binären Rohdaten-File gespeichert, welches immer das folgende Format besitzt:

- a) "General Header" von 50 locations (entspr. 50 Byte), worin die allgemeinen Informationen über das Experiment stehen, z.B. das Datum, die Uhrzeit, die Anzahl der aufgenommenen Spuren usw.
- b) Der Bereich der einzelnen Spuren, der aus zwei Teilen besteht:
 - 1) "Record Header", der die Information zu der Spur beinhaltet, z.B., das Stimulationspotential, das Membranpotential, die Art der Stimulation, die Temperatur, mögliche Kommentare usw.,
 - 2) Die eigentlichen Daten einzelner Stromspuren. Im Falle eines "Average Recording" werden die Mittelwerte als Rohdaten gespeichert.

4.1 Das P/4-Verfahren

Um den kapazitiven Strom zu eliminieren, wurde das P/4-Verfahren nach Armstrong-Bezanilla benutzt (Armstrong und Bezanilla, 1974). Zu einem bestimmten Testpuls beim Potential $V_T + V_H$ wird zusätzlich noch ein Puls bei negativem Potential $V_H - V_T/4$ aufgenommen. Der so ermittelte negative Strom wird mit 4 multipliziert und zu dem positiven Strom addiert. In Bild 8 wird die Pulsfolge des P/4 Verfahrens gezeigt.

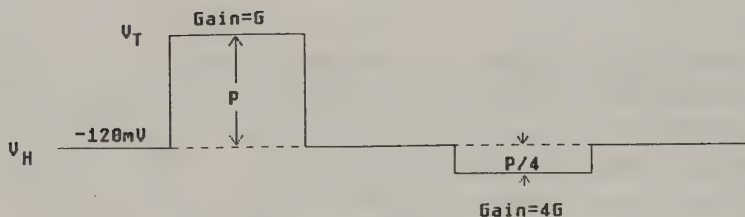


Bild 8 Das P/4-Verfahren

Im Bild ist V_H das Haltepotential (-120 mV). P ist die Amplitude des Testpulses V_T . Gain ist der Verstärkungsfaktor.

4.2 Auswertung der makroskopischen Ströme

Um die kinetischen Charakteristika des Na^+ -Kanals zu untersuchen, werden die makroskopischen Ströme mit der "macro-patch"-Methode vermessen. Diese Methode ermöglicht eine weitgehende Reduzierung der kapazitiven Ströme. Es wurden Patchpipetten mit einer Öffnung von etwa $10\mu\text{m}$ benutzt. Bei einer durchschnittlichen Expression des normalen Na^+ -Kanals befinden sich etwa 300 Kanäle unter der Pipette. Es wird ein Peakstrom von einigen hundert pA gemessen. Die minimale Grenze liegt etwa bei 100pA, weil es unter diesem Wert Schwierigkeiten bei der Auswertung wegen der nicht ausreichenden Auflösung gibt. Der Widerstand der Patchpipette beträgt etwa $0.5\text{-}1\text{M}\Omega$, was einer Öffnung von etwa $10\mu\text{m}$ Durchmesser entspricht. Die Daten werden dann mit dem Computer nach dem Hodgkin-Huxley-Modell analysiert.

4.2.1 Pulsprotokolle und Auswertung der Aktivierungskurve

Um die Aktivierungskinetik zu untersuchen, wird der Na^+ -Strom mit einem Einzelpulsprotokoll gemessen. Die Membran wird auf einem Potential gehalten und dann auf einen bestimmten Wert V_T depolarisiert. Die angelegte Spannung geht nach einigen ms wieder auf das Haltepotential V_H zurück. Das Haltepotential wird normalerweise auf -120mV eingestellt, wobei mit großer Sicherheit fast alle Kanäle inaktiviert sind. Die Pulsdauer T für den Kontroll- Na^+ -Kanal liegt zwischen 5 und 10ms. Für einige Mutanten mit extrem langsamer Kinetik werden auch längere Pulse benutzt. In Bild 9 sind die Spannungspulse und als Beispiel einige Ströme an einer Kontroll-Oozyte zu sehen.

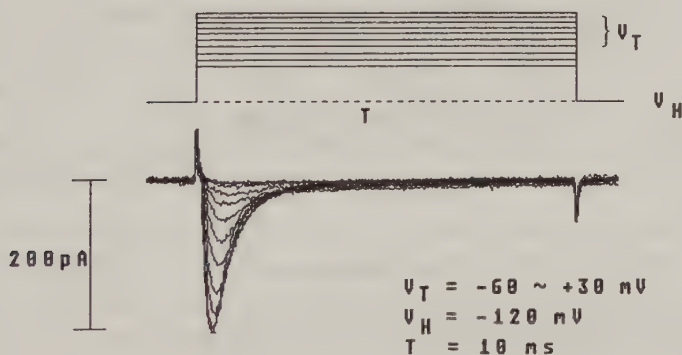


Bild 9 Makroskopische Ströme

Oben: Die Pulsprotokoll-V-Sequenz für Strom-Spannungsmessungen. Die Pulse gehen von -60 mV auf $+30\text{ mV}$ in 10 mV -Schritten. Die Pulsdauer beträgt 10 ms .

Unten: Die Ströme sind von einer Kontroll-Oozyte abgeleitet. Der maximale Strom beträgt 200 pA .

Diese Stromspuren bei verschiedenen Potentialen werden dann mit dem Programm "KINFIT" weiter analysiert. Es wird zuerst ein kubischer Fit im Bereich der Stromspitze durchgeführt, um den maximalen Strom genau zu bestimmen. Daraus erhält man eine Strom-Spannungs-Kurve. Das Bild 10 zeigt ein Beispiel der Strom-Spannungskurve.

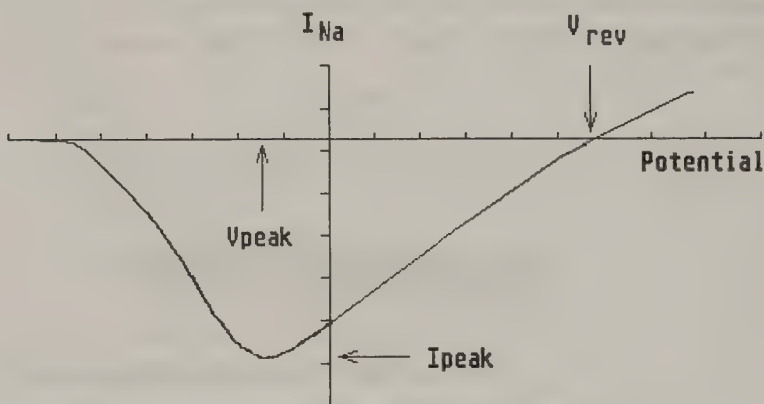


Bild 10 Strom-Spannungskurve

Im Bild ist I_{peak} der maximale Strom, V_{peak} das zugehörige Potential und V_{rev} das Umkehrpotential.

Als nächstes wird ein Fit nach Hodgkin und Huxley mit den Stromwerten, die aus dem kubischen Fit bestimmt wurden (Bild 10), durchgeführt, um die Parameter für die Aktivierung m_{∞} , z_m und τ_m zu bestimmen. Im folgenden soll eine Kurzbeschreibung der Analyse gegeben werden.

Nach Hodgkin und Huxley verläuft der Na^+ -Strom $I_{\text{Na}}(t)$ als Funktion der Zeit wie folgt (Gl. 2.1-2.4; Gl. 2.8-2.13):

$$\begin{aligned} I_{\text{Na}}(t) &= \bar{g}_{\text{Na}} \cdot m^3(t) \cdot h(t) \cdot [V - V_{\text{rev}}] \\ &= \bar{g}_{\text{Na}} \cdot m_{\infty}^3 \cdot [1 - \exp(-t/\tau_m)]^3 \cdot \\ &\quad [h_{\infty} + (1-h_{\infty}) \cdot \exp(-t/\tau_h)] \cdot [V - V_{\text{rev}}] \end{aligned} \quad (4.1)$$

wobei $h_0=1$ gesetzt wird.

Es wird zuerst in der Anstiegsphase des Stroms ein Fit mit der Funktion $[1 - \exp(-t/\tau_m)]^3$ durchgeführt, ohne die Inaktivierung zu berücksichtigen. Mit dem so ermittelten τ_m Wert wird dann in der Abfallphase des Stroms mit der Funktion $[\exp(-t/\tau_h)]$ ein Fit durchgeführt. Der gesamte Fit wird dann mit den gemessenen Stromspuren auf dem Display angezeigt und verglichen. Nach Wiederholung dieses Anpassungsverfahrens werden die besten Werte für die Zeitkonstanten τ_m und τ_h ermittelt.

In Bild 11 werden die Zeitkonstanten $\tau_m(V)$ und $\tau_h(V)$ für Kontroll-Oozyten dargestellt.

Der oben ermittelte Strom besteht aus zwei Teilen, dem Aktivierungsstrom und dem Inaktivierungsstrom. Die Idee war, den Anteil des Inaktivierungsstroms aus dem gesamten Strom zu eliminieren, so daß eine möglichst genaue Bestimmung der Werte für $m_{\infty}(V)$ möglich ist. Dazu müssen wir aber den Anteil des Inaktivierungsstroms kennen, der proportional zu $h_{\infty}(V)$ ist. Um $h_{\infty}(V)$ zu bestimmen, wird zuerst ein asymptotischer Endwert für den Strom bestimmt, der $I_{\text{Na}}(t \rightarrow \infty)$ entspricht. Nach Gleichung 4.1 gilt für $t \rightarrow \infty$:

$$I_{\text{Na}}(t \rightarrow \infty) = \bar{g}_{\text{Na}} \cdot m_{\infty}^3 \cdot h_{\infty} \cdot [V - V_{\text{rev}}] \quad , \quad (4.1a)$$

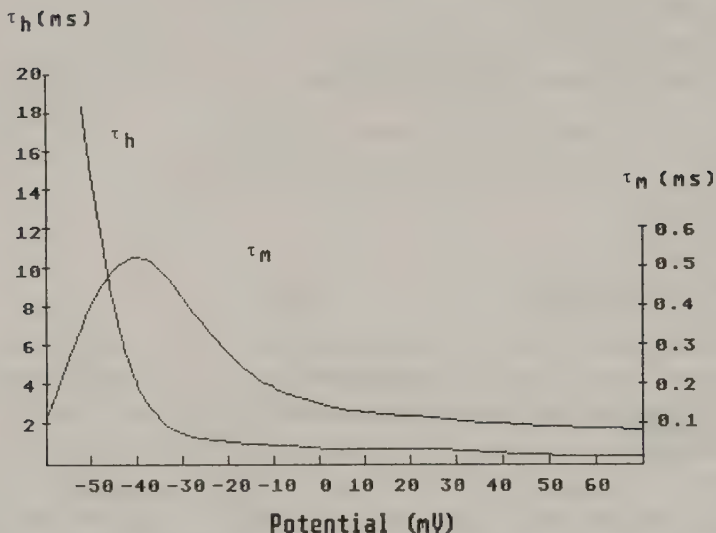


Bild 11 Die Zeitkonstante $\tau_m(V)$ und $\tau_h(V)$

Beispiel an einer Kontroll-Oocyte. Das Auswertverfahren ist im Text beschrieben.

daraus wird h_∞ näherungsweise bestimmt. Der gesamte Strom I_{Na} wird dann durch h_∞ dividiert. Der so ermittelte Strom (ohne Inaktivierung) I_p wird dargestellt als:

$$I_p = \bar{g}_m \cdot m_\infty^3(V) \cdot f(V) \quad (4.2)$$

wobei

$$f(V) = \frac{V \cdot [1 - \exp((V - V_{rev})/24.7)]}{1 - \exp(V/24.7)} \quad (4.3)$$

$$m_{\infty}(V) = 1 / \left[1 + \exp \left(z_m \cdot (V - V_m) / 24.7 \right) \right] \quad (4.4)$$

$$\text{und} \quad \bar{g}_{Na} \cdot [V - V_{rev}] = \bar{g}_m \cdot f(V)$$

V ist das Membranpotential, V_{rev} das Umkehrpotential, und V_m ist das Potential, bei dem $m_{\infty}=0.5$ ist. Die Steigung der m_{∞} -Kurve beim Potential V_m beträgt $z_m/24.7\text{mV}$. z_m entspricht der Anzahl der gating-Ladungen für das einzelne "gate" m .

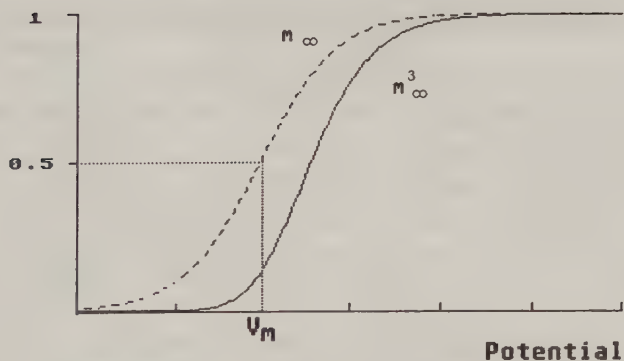


Bild 12 Die Aktivierungskurve

Im Bild sind die m_{∞}^3 - bzw. die m_{∞} -Kurve zu sehen. V_m ist das Potential, bei dem $m_{\infty}=0.5$ beträgt. Die Steigung der m_{∞} -Kurve bei V_m beträgt $z_m/24.7\text{mV}$. z_m entspricht den gating-Ladungen für ein einzelnes gate. Die gesamte formale gating-Ladung beträgt $-3 \cdot z_m$ (für m_{∞}^3).

Unsere Experimente werden normalerweise bei einer Temperatur von 15°C durchgeführt. Deshalb beträgt $kT/e=24.7\text{mV}$ statt 25mV wie in Kapitel 2.3. Die Funktion $f(V)$ ist die Goldman-Hodgkin-Katz Korrektur für das Umkehrpotential, weil unsymmetrische Ionenkonzentrationen vorliegen (Goldman, 1943; Hodgkin und Katz, 1949).

Bei dem Fit wird zuerst aus den I_P -Stromwerten $\bar{g}_{\text{Na}} \cdot m_{\infty}^3(V)$ berechnet. Dann wird ein Fit durch die $\bar{g}_{\text{Na}} \cdot m_{\infty}^3(V)$ Kurve durchgeführt und V_m und z_m berechnet. In Bild 12 wird das Beispiel eines Fits für eine Kontroll-Oozyte gezeigt. Im Bild werden die Kurve für $m_{\infty}(V)$ und $m_{\infty}^3(V)$ nebeneinander dargestellt.

Zur Charakterisierung der Aktivierung des Kanals werden dann die Werte von V_m , z_m , und $\tau_m(V)$ verwendet.

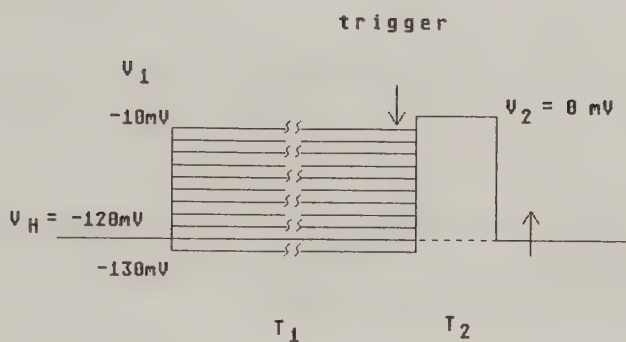
4.2.2 Pulsprotokolle und Auswertung für die steady-state-Inaktivierung

Um die steady-state-Inaktivierung zu untersuchen, werden die Zweipulsprotokolle in Bild 13 benutzt. V_H ist das Haltepotential, normalerweise gleich -120mV. V_2 wird bei maximalem Strom aus der Strom-Spannungskurve gewählt. V_1 ist der Präpuls mit variablem Potential. T_1 und T_2 sind die zugehörigen Zeiten. V_2 liegt normalerweise zwischen -20 und 0mV. V_1 variiert zwischen -130 und +10 mV.

T_1 wird normalerweise gleich 90ms gewählt. Gemessen werden die Ströme während der Zeit T_2 . Diese sind ein Maß dafür, wieviele der vorhandenen Kanälen beim jeweiligen Präpuls noch nicht inaktiviert sind. T_1 muß lang genug gewählt werden, damit während T_1 die Aktivierung vollständig ist, um den Einfluß der Aktivierung zu eliminieren.

In Bild 13b wird die dazugehörige Stromspur gezeigt. Aus dem Peakstrom wird h_{∞} in Abhängigkeit von V ermittelt. In Bild 14 wird die h_{∞} -Kurve dargestellt. Diese Kurve wird mit der Funktion

a



b

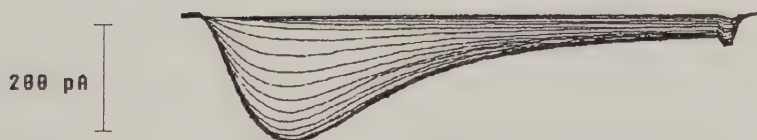


Bild 13 Pulsprotokoll für h_∞

- a: V_H ist normalerweise gleich -120mV . V_2 wird als Peak-potential der Strom-Spannungskennlinie (Bild 10) gewählt. T_1 wird so groß gewählt, daß der steady-state erreicht wird. V_1 variiert zwischen -130mV und $+10\text{mV}$.
- b: Stromspur

$$\frac{I_{Na}}{I_{max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{z_h(V - V_h)}{24.7}\right)} \quad (4.5)$$

gefittet. Zum Charakterisieren des Inaktivierungsprozesses werden die Werte von V_h und z_h genommen, die Zeitkonstante τ_h wird durch das Programm KINFIT ermittelt.

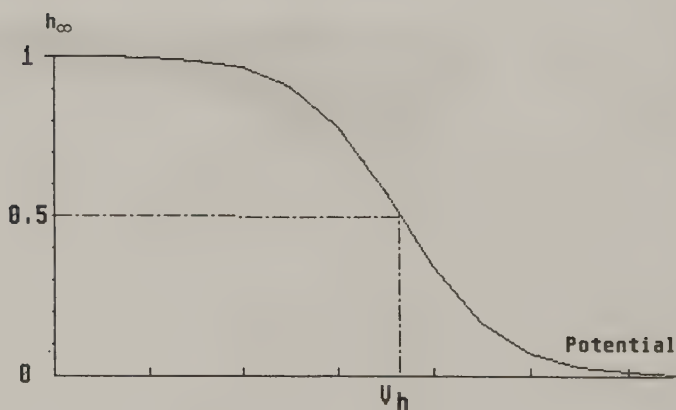


Bild 14 h_∞ -Kurve

Nach Hodgkin-Huxley. Bei V_h sind bereits 50% der Ionenkanäle inaktiviert.

4.3 Einzelkanalmessung

Ein wesentlicher Fortschritt, der durch die patch-clamp-Technik erreicht wurde, liegt darin, daß man durch Reduktion der Fläche unter der Pipette und durch Verminderung des Rauschens in der Lage ist, den Ionenstrom durch einen einzelnen Kanal zu registrieren (Sakmann und Neher, 1983). Für Einzelkanalmessungen am Na^+ -Kanal in Oozyten werden Patchpipetten mit Pipettenwiderständen von 20~30M Ω benutzt. Die anderen experimentellen Anordnungen entsprechen im wesentlichen denen bei der makroskopischen Strommessung.

In Bild 15 werden als Beispiel einige Stromfluktuationsspuren der Einzelkanäle von Kontroll-Oozyten gezeigt. Bei der Auswertung wird die Schwelle auf die Hälfte der Amplitude gesetzt. Die ermittelten Parameter wie Amplitude und Offenzeit werden mit durchgezogenen Linien im Bild dargestellt.

Bei verschiedenen Potentialwerten werden dann Amplitudenhistogramme erstellt. Durch Kurvenanpassung mit Hilfe einer Gauß'schen Funktion wird der Mittelwert einer jeden Amplitude bestimmt. Durch die Ermittlung der Amplituden für mehrere Potentiale wird anschließend der Einzelkanalleitwert berechnet.

Das gleiche wird auch für die Offenzeit durchgeführt. Die mittlere Lebensdauer wird durch einen Fit mit einer einzigen Exponentialfunktion aus dem Offenzeithistogramm ermittelt.

Im Ergebnisteil werden einige Histogramme gezeigt.

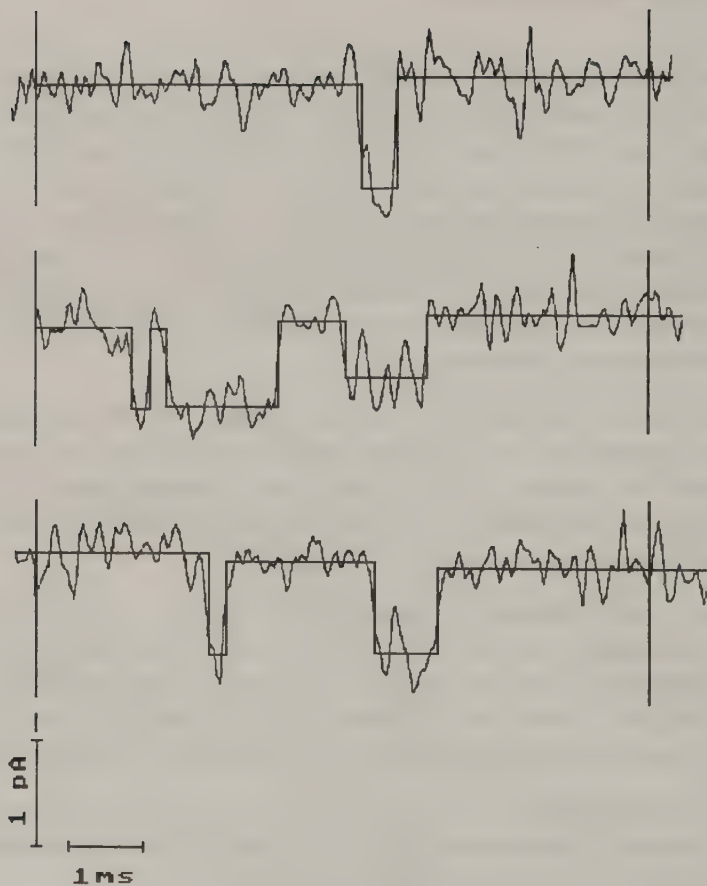


Bild 15 Einzelkanalstrommessung

Ein Beispiel für das Auswertungsverfahren. Die Ströme wurden bei -30 mV aufgenommen.

4.4 Die Rauschanalyse

Die obigen Daten zeigen, daß die Na^+ -Kanäle einen kleinen Leitwert und kurze Offenzeiten haben. Das bereitet große Schwierigkeiten bei der Einzelkanalmessung. Deshalb war es unmöglich, für alle Mutanten die Einzelkanalmessung durchzuführen.

In dieser Arbeit wurde noch eine andere Methode zur Bestimmung des Einzelkanalleitwertes benutzt, die Rauschanalyse bzw. Vielkanal-Fluktuationsanalyse (Sigworth, 1980).

4.4.1 Theoretische Grundlagen

Die Na^+ -Kanäle unter einer Patchpipette stellen ein System dar, dessen Elemente zwei verschiedene Zustände in Bezug auf den Leitwert besitzen können: offen und geschlossen. Es wurde beim Na^+ -Kanal nur ein offener Zustand angenommen. Dies lassen die bisher gewonnenen Kenntnisse vermuten (French und Horn, 1983). Es gilt die allgemeine Annahme, daß das Zeitmittel gleich dem Scharmittel ist, so daß die Varianz des zeitlichen Verlaufs von Zustandsfluktuationen eines einzelnen Kanals der Varianz von Zustandsfluktuationen eines Kanal-Ensembles zu einem Zeitpunkt gleicht.

Es ist aus der Wahrscheinlichkeitstheorie bekannt, daß:

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad , \quad (4.6)$$

wobei σ_x^2 die Varianz der Meßwerte x , n die Anzahl der Beobachtungen, x_i der Meßwert des einzelnen Ereignisses i und $\bar{x}$ der Mittelwert aller Meßwerte ist. Man kann obige Formel umformen

unter Auflösen des quadratischen Terms und Einsetzen

von $\bar{x} = \sum_0^n x_i / n$:

$$\begin{aligned}\sigma_x^2 &= \frac{1}{n} \cdot \sum_0^n x_i^2 - \frac{2}{n} \cdot \bar{x} \cdot \sum_0^n x_i + \bar{x}^2 \\ &= \left(\frac{1}{n} \cdot \sum_0^n x_i^2 \right) - \bar{x}^2 = \overline{x^2} - \bar{x}^2, \quad (4.7)\end{aligned}$$

Wir nehmen an, daß es nur einen Kanal gibt und dieser mit der Wahrscheinlichkeit p (bzw. q) den offenen (bzw. geschlossenen) Zustand besetzen kann. i sei der Strom, der durch einen Einzelkanal fließt. Nach langer Zeit werden wir einen Mittelwert von $\bar{x} = i \cdot p$ und den quadratischen Mittelwert von $i^2 \cdot p$ messen. Einsetzen in die obige Gleichung ergibt:

$$\sigma_i^2 = i^2 \cdot p - i^2 \cdot p^2 = i^2 \cdot p \cdot (1-p) = i^2 \cdot p \cdot q, \quad (4.8)$$

wobei q die Wahrscheinlichkeit für den geschlossenen Zustand ist.

Für N voneinander unabhängige und gleichartige Kanäle ist die Gesamtvarianz gleich der Summe der einzelnen Varianzen:

$$\sigma_i^2 = N i^2 p - N i^2 p^2 = N i^2 p q, \quad (4.9)$$

Durch Einsetzen des mittleren Stromwertes $I = N \cdot i \cdot p$ in die obige Gleichung bekommen wir die Formel für die Gesamtvarianz:

$$\sigma_I^2 = |I| - \frac{I^2}{N} \quad (4.10)$$

4.4.2 Auswertprogramm

In Bild 16 und 17 (a-c) werden die Auswertverfahren dargestellt. In Bild 16 sind die Schwankungen in den Stromspuren zu sehen. Sie



Bild 16 Fluktuation bei den Na^+ -Strömen

Ein Beispiel für Kontroll-Oozyten. Die Ströme wurden bei -10mV aufgenommen. Das Haltepotential betrug -120mV , die Pulslänge 4ms und die Temperatur 15°C .

werden wie bei Strom-Spannungs-Messungen mit einem Einzelpulsprotokoll aufgenommen, und zwar für ein konstantes Testpotential. In Bild 17a und b sind der mittlere Strom bzw. die Varianz des Stroms zu sehen. In Bild 17c wird die Varianz als Funktion des Stroms dargestellt. Durch einen quadratischen Fit wird der Einzelkanalstrom bestimmt. Bei bekanntem Umkehrpotential, das aus einer vorhergehenden I-V-Messung bestimmt wurde, kann man den mittleren Einzelkanalleitwert ermitteln:

$$\text{Leitwert } \gamma = \frac{i}{V - V_{\text{rev}}}$$

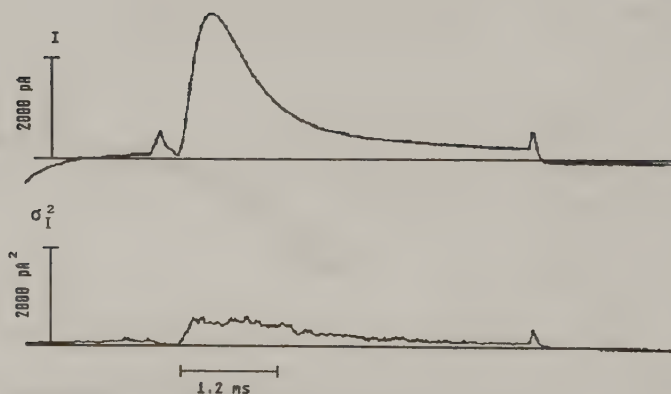


Bild 17 a), b) Rauschanalyse

In der oberen Spur ist der mittlere Strom zu sehen, in der unteren Spur die Varianz σ_I^2 .

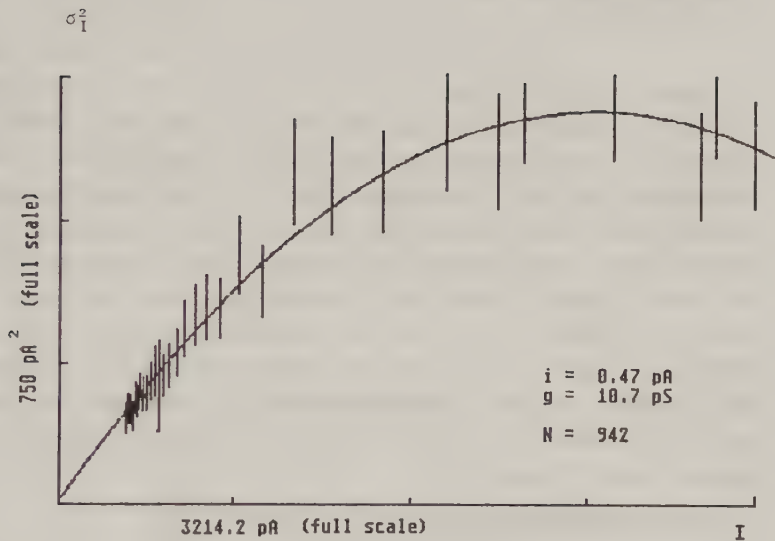


Bild 17 c) Rauschanalyse

Die Varianz wird gegen den Strommittelwert aufgetragen. Durch einen parabolischen Fit wird der Einzelkanalstrom bestimmt. Bei bekanntem Umkehrpotential wird der Einzelkanalleitwert berechnet.

i : Einzelkanalstrom
 g : Leitwert
 N : Anzahl der Kanäle

5 Meßergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus den Experimenten dargestellt. Zur Kontrolle wurden die Oozyten mit mRNA des nativen Na^+ -Kanals aus Rattenhirn (Typ II) injiziert. Dann wurden Experimente an zwei verschiedenen Arten von Mutanten durchgeführt: den Punktmutanten, bei denen einzelne Aminosäuren des S4-Segmentes ausgetauscht wurden, und den Deletionsmutanten, bei denen kleine Stücke der Aminosäuresequenz in einer der Regionen zwischen den Domänen herausgeschnitten wurden. Es stellte sich dabei heraus, daß die Punktmutation am S4-Segment einen Effekt auf die Spannungssensitivität und die Deletionsmutation zwischen den Domänen III und IV einen Effekt auf die Inaktivierung des Kanals hat.

5.1 Messungen am nativen Na^+ -Kanal

Es sind bisher keine direkten patch-clamp-Daten vom Na^+ -Kanal aus dem Rattenhirn bekannt. Darum sind die Ergebnisse dieser Messungen mit Vorbehalt zu betrachten. Bei allen Experimenten mit Mutanten wurden deshalb immer Kontrollloozyten von demselben Frosch mit Wildtyp-mRNA injiziert. Die Ergebnisse zeigten sehr gute Reproduzierbarkeit bei den Kontrollloozyten und stimmten mit den Daten aus cDNA-Injektion überein (Stühmer et al., 1986).

In den Bildern 17-22 werden die Ergebnisse für den nativen Na^+ -Kanal, der in Oozyten exprimiert wurde, graphisch dargestellt.

5.1.1 Aktivierung

Für die Messung des Aktivierungsprozesses wurden Einzelspulsprotokolle benutzt. In Bild 18 wird ein Beispiel bei Kontrollloozyten

mit einer Pulslänge von 8ms gezeigt. Die Pulse gehen von -70mV bis auf $+70\text{mV}$ in 10mV -Schritten. Bild 19 zeigt die dazu gehörende Strom-Spannungskurve. Sie besitzt einen Maximalstrom bei -10mV , mit einer Genauigkeit von $\pm 5\text{mV}$. Das Umkehrpotential liegt bei 56mV . Bild 20 zeigt die Zeitkonstanten, ermittelt mit Hilfe des Programms KINFIT, und zwar sowohl für τ_m als auch für τ_h . τ_m besitzt ein Maximum von 0.55ms bei -40mV . Im Bild wird τ_m 20-fach vergrößert dargestellt. τ_h besitzt einen viel größeren maximalen Wert als τ_m . Dies konnte bei diesem Pulsprotokoll nicht gemessen werden, da die Ströme bei den entsprechenden Potentialen viel zu klein für die Analyse waren.

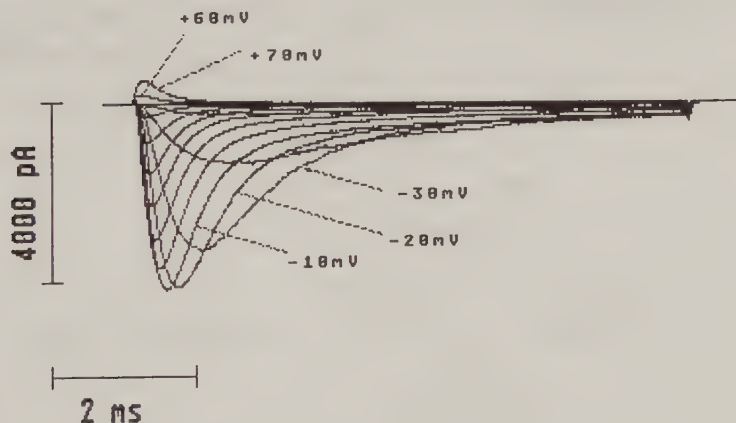


Bild 18 Natriumströme bei einer Kontrollzelle

Aufgenommen von -70mV bis $+70\text{mV}$. Peakstrom = 4nA .
Pulslänge = 8ms . Temperatur = 15°C . Haltepotential
 $V_H = -120\text{mV}$

In Bild 21 wird schließlich die m_{∞}^3 -Kurve gezeigt. Der native Na^+ -Kanal besitzt ein mittleres V_m für die Aktivierung von $-32\text{mV} \pm 7\text{mV}$; die Anzahl der entsprechenden gating-Ladungen beträgt 2.1 ± 0.2 . Dies ist die gating-Ladung für ein einzelnes 'gate'. Die gesamte gating-Ladung beträgt 6.3 ± 0.6 .

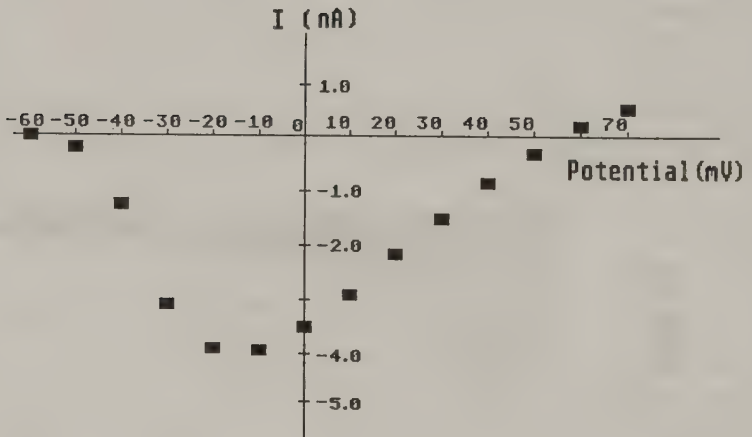


Bild 19 Strom-Spannungs-Kennlinie der Peak-Ströme

Mit einem kubischen Fit an die Stromspuren aus Bild 18 werden die Werte ermittelt:

$$I_{\max} = 4 \text{ nA}, \quad V(I_{\max}) = -13 \text{ mV}, \quad V_{\text{rev}} = 56 \text{ mV}.$$

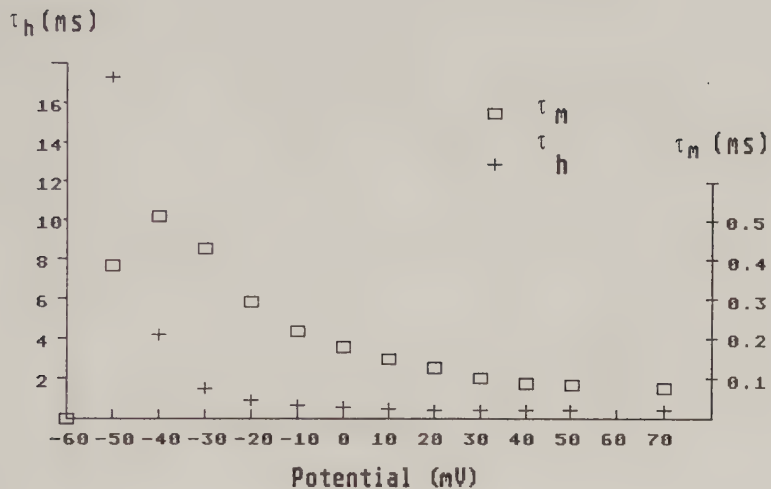


Bild 20 Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung

τ_m wird als Quadrat, τ_h als Kreuz dargestellt.

$\tau_{m,max} \approx 0.55 \text{ ms}$ bei -40 mV .

$\tau_{h,min} \approx 0.40 \text{ ms}$ bei hohen positiven Spannungen.

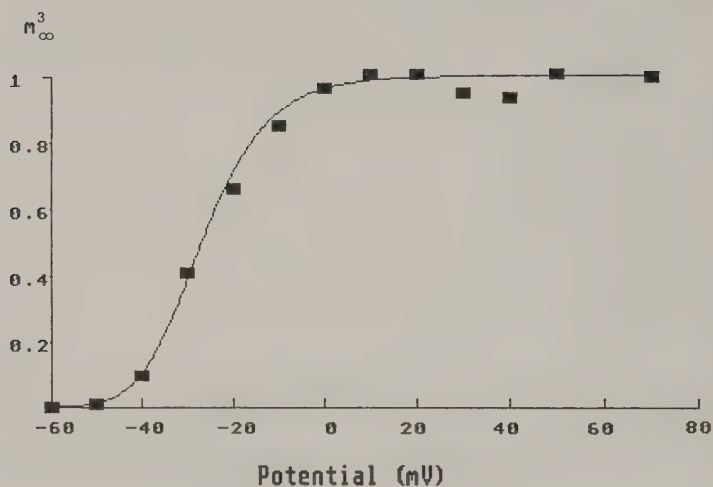


Bild 21 m_{∞}^3 -Kurve für eine Kontrolloozyte

Gezeigt wird ein repräsentatives Bild bezüglich des Mittelwerts. Die durchgezogene Linie stellt den Fit mit folgenden Parametern dar:

$$V_m = -38.6 \text{ mV}, \quad z_m = 2.9.$$

Die gesamte gating-Ladung beträgt 8.7.

5.1.2 Inaktivierung

Die Ergebnisse für die Inaktivierung werden in Bild 22 und 23 dargestellt. Es wurde ein Zweipulsprotokoll benutzt, wie es in Bild 12 beschrieben wurde. Der Präpuls hat eine Länge von 90ms und variiert zwischen -130mV und 0mV in 5mV-Schritten. Der Testpuls liegt bei einem Potential von -10mV. Dies entspricht dem Peakpotential aus der Strom-Spannungskurve (Bild 20). Die nativen Kanäle haben im Durchschnitt ein Halbwertspotential für die Inaktivierung von $-61\text{mV} \pm 9\text{mV}$ und für die gating-Ladungen von 2.4 ± 0.3 .

Alle Parameter für den nativen Na^+ -Kanal stehen in den Tabellen 3.1 - 3.5 (Abschnitt 5.3).

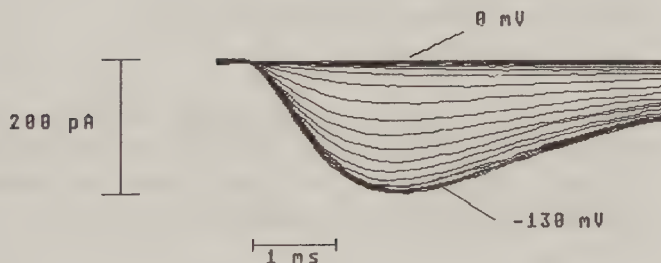


Bild 22 Natriumströme nach dem h_∞ -Protokoll

Aufgenommen mit h_∞ -Protokoll (s. Bild 13).

$V_1 = -130\text{ mV}$ bis 0 mV . $T_1 = 90\text{ ms}$. $V_2 = -15\text{ mV}$. $T_2 = 5\text{ ms}$.

Temperatur = 15°C .

Der maximale Strom beträgt 200 pA bei $V_1 = -130\text{ mV}$.

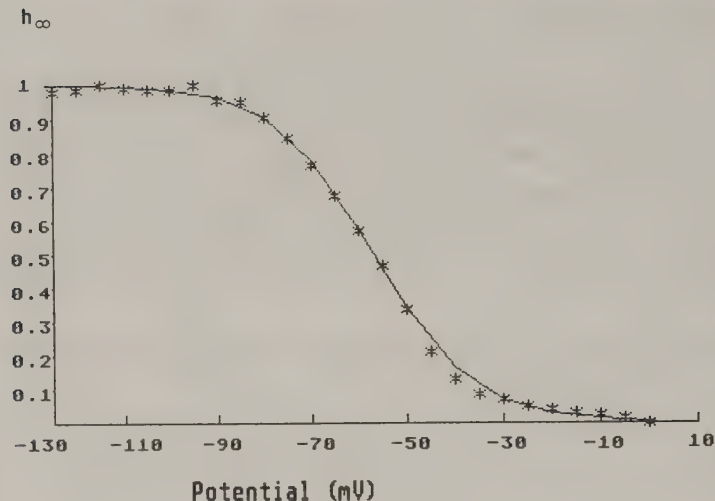


Bild 23 steady-state-Inaktivierung

Die Meßpunkte (Stern) sind aus Bild 22 entnommen. Sie werden durch einen kubischen Fit als Maxima der Ströme ermittelt. Sie sind auf den größten Maximalstromwert normiert. Die durchgezogene Linie stellt den Fit für h_{∞} nach der Formel :

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{z_h(V - V_h)}{24.7}\right)}$$

mit: $V_h = -57\text{mV}$, $z_h = 2.4$ dar.

5.1.3 Einzelkanalmessung

Am nativen Na^+ -Kanal wurde neben dem makroskopischen Strom auch der Einzelkanalstrom aufgenommen. In Bild 24 wird ein Beispiel gezeigt. Es ist an einer Kontrollloozyte bei einem Testpotential von -30 mV aufgenommen. In Bild 25 a) wird das entsprechende Amplitudenhistogramm gezeigt. Bild 25 b) zeigt das Lebensdauerhistogramm und Bild 26 die Strom-Spannungskennlinie für den Einzelkanal. Daraus ermittelt man einen Einzelkanalleitwert von $19 \pm 5 \text{ pS}$ und eine mittlere Lebensdauer von 0.43 ms .

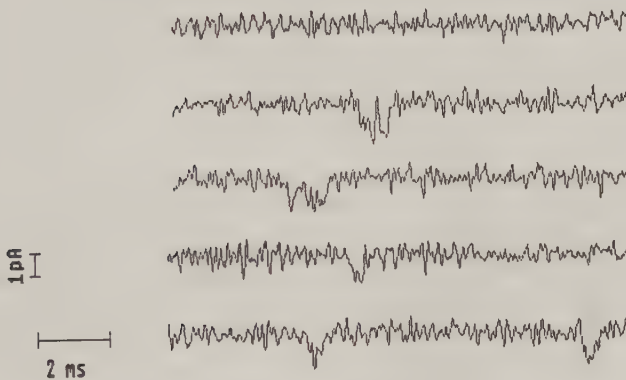


Bild 24 Einzelkanalmessung bei einer Kontrollloozyte

Gezeigt sind einige Stromspuren bei einem Potential von -30 mV . Der Pipettenwiderstand beträgt $20 \text{ M}\Omega$ und es wurde mit 2 kHz gefiltert.

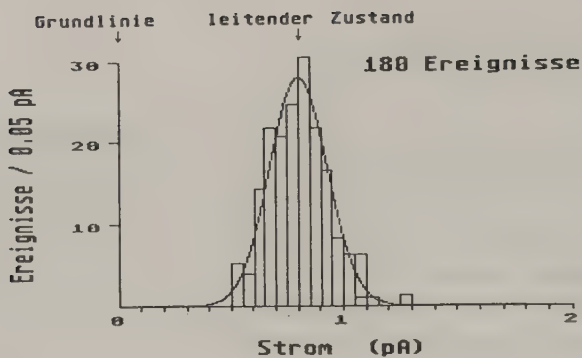


Bild 25a) Amplitudenhistogramm

Ermittelt aus 180 Ereignissen bei -30mV .
 Wahrscheinlichste Amplitude des Einzelkanalstroms
 ist $0,78\text{ pA}$.

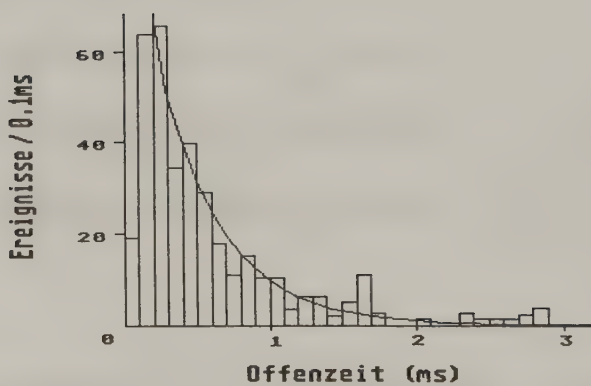


Bild 25b) Offenzeithistogramm

Ermittelt aus 180 Ereignissen bei -30mV .
 Mittlere Lebensdauer = $0,43\text{ms}$

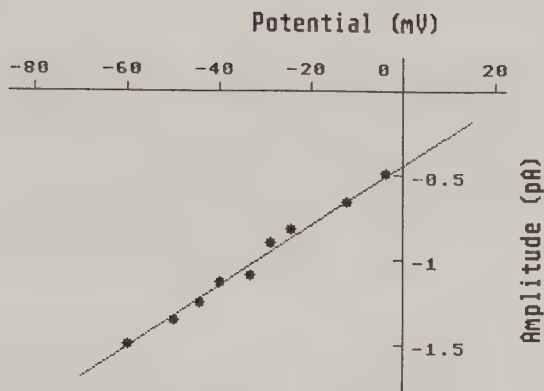


Bild 26 Strom-Spannungskurve des Einzelkanals

Gefittet zwischen -60 und 0 mV.

Einzelkanalleitwert $\sigma = 19 \text{ pS}$.

Die Einzelkanalmessung bedarf eines sehr großen Zeitaufwandes und bereitet große Schwierigkeiten, wenn das Signal-Rauschverhältnis der Messung nicht optimal ist. Deshalb wurde zur Bestimmung des Einzelkanalleitwertes eine andere Methode, nämlich die Rauschanalyse, benutzt.

5.1.4 Rauschanalyse

Bei der Vielkanalfluktuationsmessung wurden jeweils mehr als 100 Pulse gemessen und daraus die Varianz des Stromes σ_I^2 ermittelt. Nach der Methode in Bild 17c) werden dann die Einzelkanalströme und die Anzahl der Kanäle bestimmt. Das Umkehrpotential wird wie bei der Strom-Spannungskennlinie bestimmt. Anschließend wird der mittlere Einzelkanalleitwert berechnet.

Für den Na^+ -Kanal aus Rattenhirn (Typ II) ergibt sich ein Einzelkanalleitwert von 13pS. Es zeigt sich ein Unterschied zwischen dem Wert der direkten Einzelkanalmessung und dem der Rauschanalyse. Das liegt wahrscheinlich an Meßfehlern bei der Aufnahme des Rauschens. Bei einer größeren Anzahl von Meßpulsen würde man einen kleineren Fehler erwarten. Um die Einzelkanalleitwerte von Kontrollloozyten und verschiedenen Mutanten vergleichen zu können, werden bei allen Messungen stets die gleichen Bedingungen eingehalten.

5.2 Messungen an Mutanten mit Punktmutation in S4

In diesem Teil werden die Ergebnisse zusammengefaßt, die sich bei den Mutanten mit Punktmutationen im S4-Segment ergeben haben. Da das S4-Segment ein auffallendes Strukturelement darstellt, wurden ihm verschiedene Funktionen zugeordnet. Besonders wurde vermutet, daß das S4-Segment eine strukturelle Komponente des gating-Mechanismus darstellen könnte.

Ala Leu ²¹⁷Arg Thr Phe ²²⁰Arg Val Leu ²²³Arg Ala Leu ²²⁶Lys Thr Ile Ser Val Ile Pro Gly Leu ²²⁹

Domäne I, S4

Val Leu ⁸⁵⁰Ala Ser Phe ⁸⁵³Arg Leu Leu ⁸⁵⁶Arg Val Phe ⁸⁵⁹Lys Leu Ala ⁸⁶²Lys Ser Trp Pro Thr Leu

Domäne II, S4

Leu Gly Ala Ile ¹³⁰³Lys Ser Leu ¹³⁰⁶Arg Thr Leu ¹³⁰⁹Arg Ala Leu ¹³¹²Arg Pro Leu ¹³¹⁵Arg Ala Leu Ser ¹³¹⁹Arg Phe Glu

Domäne III, S4

¹⁶²⁶Arg Val Ile ¹⁶²⁹Arg Leu Ala ¹⁶³²Arg Ile Gly ¹⁶³⁵Arg Ile Leu ¹⁶³⁸Arg Leu Ile ¹⁶⁴¹Lys Gly Ala ¹⁶⁴⁴Lys Gly Ile ¹⁶⁴⁷Arg

Domäne IV, S4

Bild 27 Die Sequenz der S4-Segmente

Die positiv geladenen Aminosäuren sind eingerahmt dargestellt.
Die Grenzen der jeweiligen Segmente sind nicht genau angebbar.

5.2.1 Zusammenfassung aller gemessenen Mutanten

Aus den oben genannten Gründen wurden bei den meisten Mutanten die geladenen Aminosäuren (Arg und Lys) jeweils durch eine ungeladene Aminosäure ersetzt, um mögliche Änderungen bei den Kanalcharakteristika zu erzielen. In Bild 27 werden die Aminosäuresequenzen der S4-Segmente der vier Domänen gezeigt. Die geladenen Aminosäuren Arg und Lys sind zusätzlich durch ein Kästchen gekennzeichnet.

Tabelle 2 Zusammenfassung der Punkt-Mutanten

REPEAT I							
Mutante	Position der Änderung				Expression		
AM 21	R217Q				+		
AM 29	R217Q	R220Q			+		
AM 30	R217Q		R223Q		+		
AM 31	R217Q			K226Q	+		
AM 34	R217Q	R220Q	R223Q		+		
AM 35	R217Q	R220Q		K226Q	+		
AM 36	R217Q		R223Q	K226Q	+		
AM 18	R217Q	R220Q	R223Q	K226Q	+		
AM 22		R220Q			+		
AM 32		R220Q	R223Q		+		
AM 33		R220Q		K226Q	+		
AM 25		R220Q	R223Q	K226Q	+		
AM 23			R223Q		+		
AM 24			R223Q	K226Q	+		
AM 5				K226Q	+		
AM 44				K226R	+		
AM 26				K226E	+		
AM 45				K226D	+		
AM 47				K226R	S229R	+	
AM 46					S229R	+	
AM 27					S229K	+	
AM 28					S229K	P232R	+

Tabelle 2 Fortsetzung

REPEAT II

AM 6					K862Q	+
AM 37				R859Q	K862Q	+
AM 38			R856Q		K862Q	+
AM 39		R853Q	R856Q	R859Q	K862Q	+
AM 19	R850Q	R853Q	R856Q	R859Q	K862Q	

REPEAT III

AM 7					R1319Q	+
AM 40					R1315Q R1319Q	+
AM 41				R1312Q	R1315Q R1319Q	+
AM 42			R1309Q	R1312Q	R1315Q R1319Q	+
AM 43		R1306Q	R1309Q	R1312Q	R1315Q R1319Q	-
AM 20	K1303Q	R1306Q	R1309Q	R1312Q	R1315Q R1319Q	-

REPEAT IV

AM 4						R1647Q	+
AM 11						K1644Q R1647Q	+
AM 12					K1641Q	K1644Q R1647Q	+
AM 13				R1638Q	K1641Q	K1644Q R1647Q	+
AM 14			R1635Q	R1638Q	K1641Q	K1644Q R1647Q	-
AM 15		R1632Q	R1635Q	R1638Q	K1641Q	K1644Q R1647Q	-
AM 16	R1629Q	R1632Q	R1635Q	R1638Q	K1641Q	K1644Q R1647Q	-
AM 17	R1626Q	R1629Q	R1632Q	R1635Q	R1638Q	K1641Q K1644Q R1647Q	-
AM 8	R1626Q					R1647Q	+
AM 9			R1635Q				+
AM 10						R1647E	+
AM 2				I1636V			+
AM 3					K1641R		+

Doppelmutanten

	Domäne I		Domäne II		
AM 5.37	K226Q		K859Q	K862Q	+
AM 5.38	K226Q	R856Q		K862Q	+
AM 23.37	R223Q		K859Q	K862Q	+
AM 23.38	R223Q	R856Q		K862Q	+
	Domäne III		Domäne IV		
AM 40.13	R1315Q	R1319Q	R1638Q	K1641Q K1644Q R1647Q	+

In Tabelle 2 werden alle gemessenen Mutanten zusammengefaßt. Die Bezeichnung in der ersten Spalte ist eine interne Benennung während der Experimente. In der zweiten Spalte werden die Änderungen durch die Punktmutation angegeben. Der erste Buchstabe bezeichnet die alte, der letzte die neue Aminosäure. Die Ziffer gibt die Position der ausgetauschten Aminosäure an. In der letzten Spalte sind die Ergebnisse der Expression angegeben. Positive Expression bedeutet, daß die Mutante einen meßbaren Strom hervorbrachte.

Es wurden von einer bis zu acht Aminosäuren gleichzeitig in einer Domäne ausgetauscht. Die Mutanten, bei denen mehr als vier Aminosäuren ausgetauscht wurden, AM14-17, 19, 20 und 43, zeigten keine funktionsfähige Expression in Oozyten. Einige Ladungen werden wahrscheinlich bei der Faltung des Proteins oder beim Einbau in die Plasmamembran benötigt.

Die Mutanten mit Änderungen von einer bis zu vier Aminosäuren in einer Domäne sind in Oozyten erfolgreich exprimiert worden. Einige von ihnen zeigten auch tatsächlich geänderte Eigenschaften. Im folgenden werden die Ergebnisse beschrieben, die sich bei den Punktmutanten ergaben.

5.2.2 Effekte an der Aktivierungskurve

Es wurden hauptsächlich Mutanten im S4-Segment von Domäne I bzw. II untersucht, bei denen auch tatsächlich Effekte gefunden wurden. Bei Domäne III bzw. IV wurden nur einige Mutanten getestet. In Tabelle 3.1-3.5 werden die Ergebnisse zusammengestellt.

In Tabelle 3.1 sind zuerst die Ergebnisse für alle Mutanten mit einer Ladungsänderung gezeigt. Es wird sowohl die Reduzierung (-) als auch die Erhöhung (+) der positiven Ladung berücksichtigt.

Daraus ist zu sehen, daß die Mutationen in den Positionen 223, 226, 229 (Domäne I) und 862 (Domäne II) eine Verschiebung von V_m um

Tabelle 3.1

Mutanten mit einer Ladungsänderung

Mutante	Position	ΔQ	V_m (mV)	z_m	V_h (mV)	z_h
WILD		0	-32 ± 7	2.1 ± 0.2	-61 ± 9	2.4 ± 0.3
Domäne I						
AM 21	R217Q	-1	-34 ± 7	2.1 ± 0.3	-66 ± 8	2.6 ± 0.3
AM 22	R220Q	-1	-40 ± 10	1.5 ± 0.1	-67 ± 21	2.5 ± 0.2
AM 23	R223Q	-1	-20 ± 9	1.6 ± 0.2	-55 ± 14	2.1 ± 0.5
AM 5	R226Q	-1	-13 ± 2	1.8 ± 0.2	-67 ± 6	2.2 ± 0.2
AM 46	S229R	+1	-25 ± 3	2.1 ± 0.2	-61 ± 5	2.4 ± 0.2
AM 27	S229K	+1	-19 ± 4	2.0 ± 0.1	-52 ± 6	2.3 ± 0.2
Domäne II						
AM 6	K862Q	-1	-22 ± 5	2.1 ± 0.1	-70 ± 7	2.6 ± 0.2
Domäne III						
AM 7	R1319Q	-1	-34 ± 4	2.4 ± 0.3	-67 ± 27	3.0 ± 0.5
Domäne IV						
AM 4	R1647Q	-1	-39 ± 6	2.7 ± 0.7	-89 ± 14	2.5 ± 0.1
AM 9	R1635Q	-1	-38 ± 13	2.6 ± 0.3	-74 ± 18	3.5 ± 0.9

mehr als 10mV verursachen. Dagegen zeigen die Mutationen in den Positionen 217, 220 (Domäne I), 1319 (Domäne III) und 1635, 1647 (Domäne IV) keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivierung. Bei der Inaktivierung bleiben die Parameter bei allen obigen Mutanten in den Domänen I, II und III fast konstant. Nur die Mutanten AM4 und AM9 in der Domäne IV zeigen eine Veränderung

der Parameter.

In Bild 28 ist ein Vergleich zwischen den Positionen 217 (AM21), 220 (AM22), 223 (AM23) und 226 (AM5) dargestellt. Im Bild stellt die durchgezogene Linie den besten Fit für den Wildtyp-Kanal dar. Die Mutanten werden durch verschiedene Symbole dargestellt.

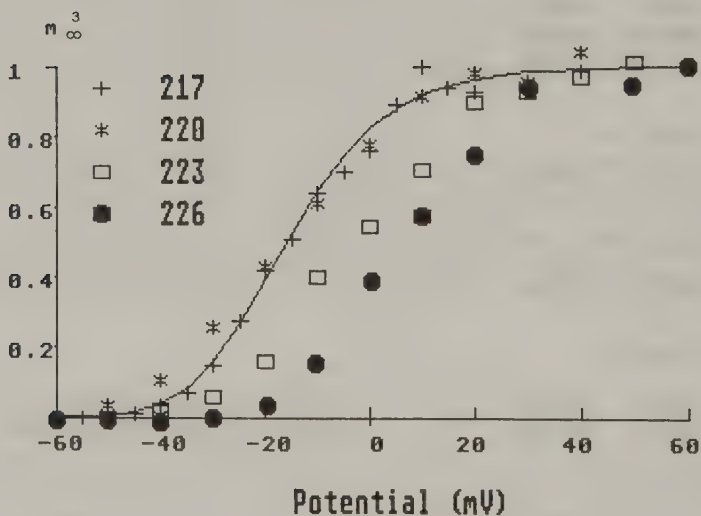


Bild 28 Aktivierungskurve

Von den Mutanten wird jeweils eine repräsentative Messung gezeigt. Die durchgezogene Linie entspricht dem besten Fit für den Wildtyp Na^+ -Kanal.

Tabelle 3.2 Mutanten mit zwei Ladungsänderungen

Mutante	Position		V_m (mV)	z_m	V_h (mV)	z_h	
Wild			-32 ± 7	2.1 ± 0.2	-61 ± 9	2.4 ± 0.3	
Domäne I							
AM 26	K226E		-3 ± 6	1.2 ± 0.1	-71 ± 0	2.5 ± 0.0	
AM 45	K226D		-12 ± 10	1.5 ± 0.2	-69 ± 14	2.4 ± 0.5	
AM 29	R217Q	R220Q	-51 ± 5	1.2 ± 0.2	-87 ± 5	2.9 ± 0.3	
AM 30	R217Q	R223Q	-49 ± 2	1.3 ± 0.1	-78 ± 2	2.9 ± 0.3	
AM 31	R217Q	K226Q	-14 ± 10	1.5 ± 0.1	-83 ± 7	2.6 ± 0.5	
AM 32	R220Q	R223Q	-28 ± 16	1.6 ± 0.2	---	---	*
AM 33	R220Q	K226Q	-14 ± 5	1.4 ± 0.1	-61 ± 3	2.3 ± 0.6	
AM 24	R223Q	K226Q	-6 ± 6	1.4 ± 0.2	-70 ± 14	2.0 ± 0.2	
AM 47	K226R	S229R	-25 ± 4	2.0 ± 0.1	-76 ± 10	2.7 ± 0.2	
Domäne II							
AM 37	R859Q	K862Q	-5 ± 7	2.1 ± 0.2	-60 ± 12	1.9 ± 0.5	
AM 38	R856Q	K862Q	-12 ± 6	1.7 ± 0.3	-60 ± 15	2.3 ± 0.6	
Domäne III							
AM 40	R1315Q	R1319Q	-28 ± 7	2.3 ± 1.3	---	---	*
AM 8	R1626Q	R1647Q	-42 ± 9	1.6 ± 0.6	-82 ± 9	2.5 ± 0.3	
AM 10	R1647E		-37 ± 8	2.0 ± 0.3	-86 ± 5	2.7 ± 0.2	
AM 11	K1644Q	R1647Q	-34 ± 5	2.1 ± 0.2	-80 ± 7	2.8 ± 0.2	

* Die h_{∞} -Messungen konnten hier wegen schlechter Stromauflösung nicht durchgeführt werden.

In der Tabelle 3.2 werden die Ergebnisse für die Mutanten mit einer Änderung von zwei Ladungen gezeigt. Dabei handelt es sich bei allen Mutanten um eine Reduzierung von zwei positiven Ladungen ($\Delta Q = -2$). Hier bekommt man wieder ähnliche Effekte wie oben. Die Positionen 226, 229, 232 (Domäne I) und die Position 856, 862 (Domäne II) zeigen einen großen Einfluß auf die Aktivierung, während andere Positionen keine Rolle spielen.

Man sieht aus den Tabellen 3.1 und 3.2, daß es zwischen den Mutanten mit einer und denen mit zwei Ladungsänderungen keine eindeutige Relation gibt, so daß man keine additive Aussage machen kann.

Tabelle 3.3 Mutanten mit drei Ladungsänderungen

Mutante	Position			V_m (mV)	z_m	V_h (mV)	z_h
WILD				-32 ±7	2.1 ±0.2	-61 ±9	2.4 ±0.3
Domäne I							
AM34	R217Q	R220Q	R223Q	-44 ±13	1.2 ±0.2	-74 ±0	2.3 ±0
AM35	R217Q	R220Q	K226Q	-41 ±7	1.4 ±0.2	-82 ±12	1.9 ±0.5
AM36	R217Q	R223Q	K226Q	-24 ±7	1.8 ±0.6	-67 ±8	2.2 ±0.7
AM25	R220Q	R223Q	K226Q	-19 ±6	1.7 ±0.1	---	---
Domäne III							
AM41	R1312Q	R1315Q	R1319Q	---	---	---	---
Domäne IV							
AM12	K1641Q	K1644Q	R1647Q	-37 ±2	2.6 ±0.2	-83 ±1.6	2.8 ±0.1

Tabelle 3.4 Mutanten ohne Ladungsänderung

Mutante	Position	V_m (mV)	z_m	V_h (mV)	z_h
WILD		-32 ± 7	2.1 ± 0.2	-61 ± 9	2.4 ± 0.3
Domäne I					
AM44	K226R	-33 ± 3	2.5 ± 0.7	-72 ± 0	2.5 ± 0.0
Domäne IV					
AM2	I1636V	-30 ± 7	1.6 ± 0.4	-73 ± 16	2.0 ± 0.3
AM3	K1641R	-40 ± 5	2.3 ± 0.6	-84 ± 6	2.9 ± 0.6

In der Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse für die Reduzierung von drei positiven Ladungen ($\Delta Q = -3$) zu sehen. Es ist auffallend, daß die Mutanten AM34 und AM35 eine verringerte Zahl von gating-Ladungen (z_m) besitzen. Im Gegensatz zu anderen Mutanten mit Änderungen an den Positionen 223 und 226 ist das Aktivierungspotential V_m um 10mV negativer geworden. Das gleiche kann man auch an den Mutanten AM22 (Tabelle 3.1), AM29 und AM30 (Tabelle 3.2) sehen. Es ergibt sich insgesamt die Tendenz, daß die Reduzierung der positiven Ladung am 217-Ende eine Verschiebung von V_m in die negative Richtung verursacht. Die Mutanten ohne Ladungsänderung zeigen keine deutlichen Veränderungen gegenüber der Kontrolle (Tabelle 3.4). Nur bei der Mutante AM2 (I1636V) wurde eine Änderung bei z_m (1.6 gegenüber 2.1 beim Wildtyp) beobachtet.

5.2.3 Vergleich der gating-Ladungen

In Bild 29 werden die gating-Ladungen z_m für verschiedene Mutanten dargestellt. Die Werte sind aus den Tabellen 3.1 - 3.4 zu entnehmen. Die gating-Ladungen werden in Beziehung zur Anzahl der geänderten geladenen Aminosäuren gesetzt.

Die gating-Ladungen ändern sich mit der Zunahme der Anzahl der geänderten Ladungen. Dies weist auf eine direkte Relation zwischen den Ladungen in S4 und dem spannungsabhängigen Schalter (gate) hin.

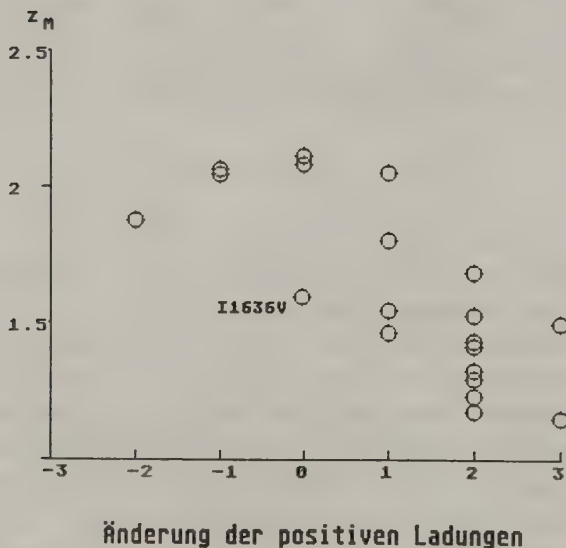


Bild 29 Vergleich der gating-Ladungen

z_m sind die entsprechenden Werte aus den Tabellen 3.1 - 3.4, nur um eine Stelle hinter dem Komma genauer. Die Änderungen an absoluter positiver Ladung sind aus der Tabelle 2 zu entnehmen.

5.2.4 Additive Effekte bei verschiedenen Domänen

In der Tabelle 3.5 werden einige Doppelmutanten gezeigt, bei denen gleichzeitig Mutationen an zwei verschiedenen Domänen durchgeführt wurden. In Bild 30 wird ein Vergleich zwischen AM5, AM37 und AM5.37 dargestellt. Es ist ein additiver Effekt zu erkennen.

Tabelle 3.5 Doppelmutanten

Mutante	Position in Domäne		V_m (mV)	z_m	V_h (mV)	z_h
	I	II				
WILD			-32 ± 7	2.1 ± 0.2	-61 ± 9	2.4 ± 0.3
AM 5.37 K226Q		R859Q,K862Q	11 ± 9	1.8 ± 0.3	-83 ± 8	2.8 ± 0.3
AM 5.38 K226Q		R856Q,K862Q	18 ± 5	1.4 ± 0.5	---	---
AM23.37 R223Q		K859Q,K862Q	-18 ± 1.9	2.5 ± 0.2	-79 ± 12	2.5 ± 0.6
AM23.38 R223Q		R856Q,K862Q	0	1.8	---	---

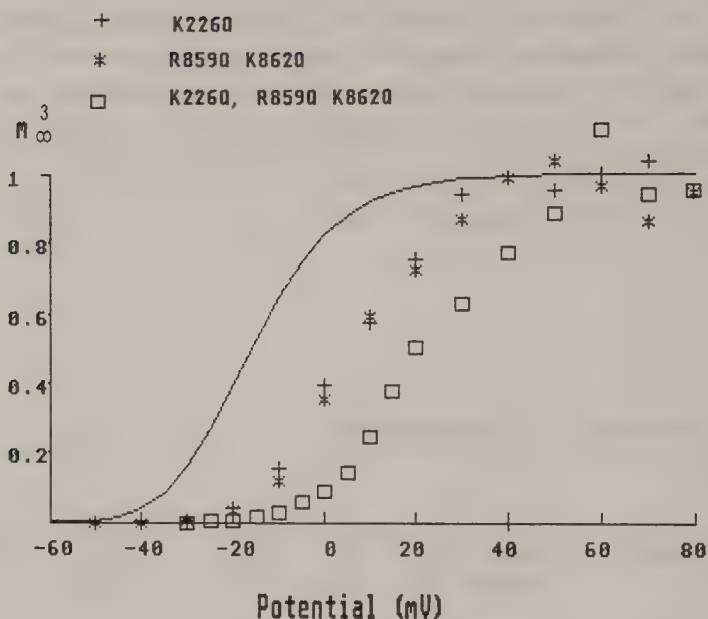


Bild 30 Additiver Effekt bei der Aktivierung

Die durchgezogene Linie ist für die Kontrolle(Wildtyp).
 AM5 ist mit Kreuz, AM37 mit Stern und AM5.37 mit
 Quadrat als Datensymbol dargestellt.

Die Parameter :

AM5	:	$V_m = -13$ mV	$z_m = 1.8$
AM37	:	$V_m = -5$ mV	$z_m = 2.1$
AM5.37	:	$V_m = 11$ mV	$z_m = 1.8$

5.2.5 Vielkanal-Fluktuationsanalyse

Es wurden Fluktuationsmessungen an den verschiedenen Mutanten durchgeführt, um die Leitwerte zu kontrollieren. Aus technischen Gründen wurden keine Einzelkanalmessungen an den Mutanten gemacht, weil dieses einen sehr großen Zeitaufwand erfordert hätte.

In der Tabelle 4 werden die Ergebnisse der Fluktuationsanalyse zusammengefaßt. Es ist keine Änderung des Kanalleitwertes über einen Wert von 30% zu sehen. Dies ist auch nicht zu erwarten, weil der Leitwert doch mehr von der Innenwand des Kanals bestimmt wird, an der die S4-Helix entsprechend den Modellvorstellungen nicht beteiligt ist.

Tabelle 4 **Rauschanalyse**

Mutante	Domäne	Position	Leitwert	
Kontrolle	--		13.1	pS
AM 21	I	R217Q	12.9	pS
AM 22	I	R220Q	17.0	pS
AM 23	I	R223Q	14.6	pS
AM 5	I	K226Q	11.1	pS
AM 6	II	K862Q	14.4	pS
AM 37	II	R859Q,K862Q	15.4	pS
AM 7	III	R1319Q	12.7	pS
AM 4	IV	R1647Q	12.9	pS
AM 9	IV	R1635Q	15.2	pS
AM 5.37	I + II	K226Q,K859Q,K862Q	11.2	pS

5.3 Messungen der Deletionsmutanten

Bei Experimenten mit verschiedenen Substanzen wurde beobachtet, daß die Eigenschaften des Na^+ -Kanals verändert wurden, insbesondere dessen Inaktivierung. Einige dieser Substanzen wirken von der Innenseite der Membran her. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Regionen an der cytoplasmatischen Membranseite für die Inaktivierung des Kanals eine wichtige Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurden neben den Punktmutanten mit Mutationen an den S4-Segmenten auch einige Mutanten mit Segmentänderungen in den Regionen zwischen den verschiedenen Domänen untersucht. Diese Regionen liegen nach dem Modell von Numa auf der inneren Seite der Membran.

5.3.1 Tabelle der Mutanten

In Bild 31 sind die Deletionsmutanten aufgelistet. Es wurden Mutanten mit Änderungen am N-terminalen und am C-terminalen Ende, sowie jeweils zwischen den Regionen I/II, II/III und III/IV vermessen. Die betreffenden Regionen zwischen den Domänen wurden mit X, Y und Z bezeichnet.

In Bild 32 werden einige Stromaufnahmen der Deletionsmutanten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle gezeigt.

Dabei ist sehr auffallend, daß eine dieser Mutanten, die den Sequenzschnitt zwischen der Domäne III und Domäne IV aufweist, eine ganz andere Charakteristik besitzt als die anderen Mutanten. Diese Mutante wird im nächsten Abschnitt näher betrachtet.

Zuerst ist eine Zusammenfassung aller Deletionsmutanten in Tabelle 5 gegeben. Es wurden wie bei den Punktmutanten die charakteristischen Größen V_m , z_m und V_h , z_h ermittelt. Hinzu kommen noch die Zeitkonstante τ_m mit ihrem Maximum und die

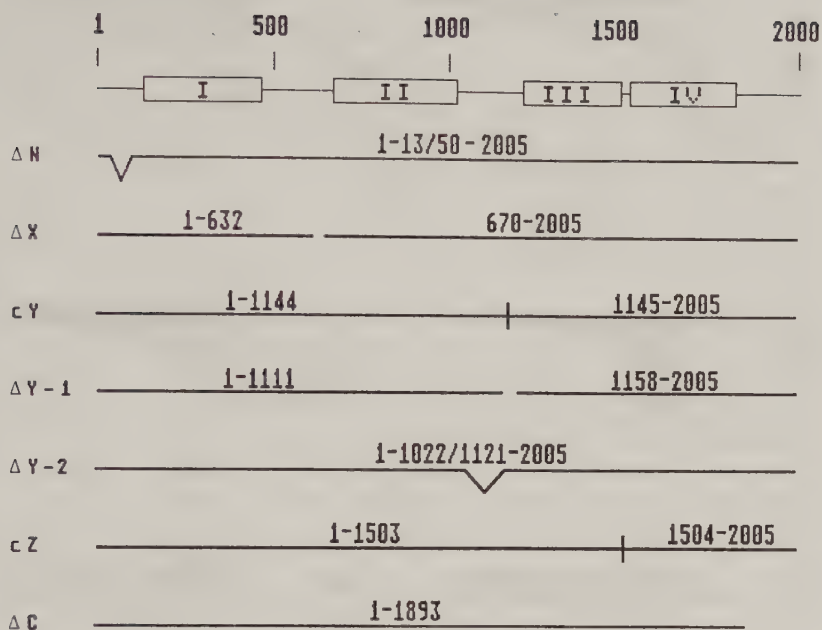
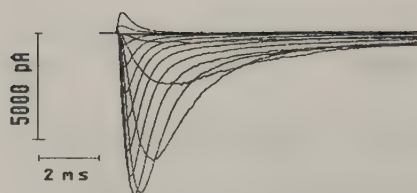


Bild 31 Tabelle der Schnittstellen in den Deletionsmutanten

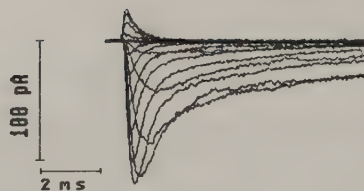
In den obigen Spuren werden die Molekülsequenzen schematisch dargestellt. Die vier homologen Domänen sind als Rechtecke gekennzeichnet. Darunter sind die jeweiligen Mutanten mit ihrer Schnittposition angegeben.

Index C heißt "cut" = Schnitt.

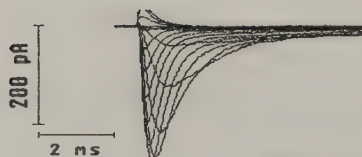
Index Δ heißt "delete" = Entfernen eines Segmentstücks.



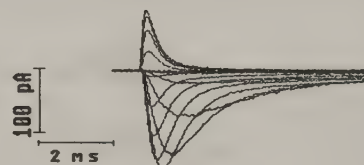
Kontrolle



$\Delta Y-2$



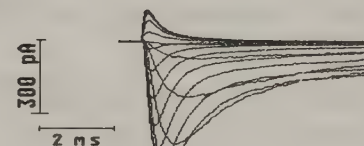
ΔC



ΔH



cY



$\Delta Y-1$



cZ

Bild 32 Na^+ -Ströme der Deletionsmutanten

Alle Spuren wurden mit dem Einzelschrittprotokoll mit 10 mV-Schritten aufgenommen. Daneben wird die jeweilige Zeit- und Stromskala gezeigt.

Tabelle 5 Ergebnisse der Deletionsmutanten

Mutante	V_m (mV)	z_m	$\tau_{m,max}$ (ms)	V_h (mV)	z_h	$\tau_{h,min}$ (ms)
WILD	-32 ± 7	2.1 ± 0.2	0.51 ± 0.08	-61 ± 9	2.4 ± 0.3	0.35 ± 0.05
ΔN	-31 ± 3	2.0 ± 0.2	0.36 ± 0.05	-68 ± 11	1.8 ± 0.2	0.28 ± 0.04
ΔC	-40 ± 8	2.2 ± 0.2	0.33 ± 0.06	-80 ± 9	3.0 ± 0.4	0.25 ± 0.05
ΔX	---	---	---	---	---	---
cY	-46 ± 7	2.0 ± 0.3	0.40 ± 0.08	-75 ± 10	2.1 ± 0.4	0.32 ± 0.05
$\Delta Y-1$	-33 ± 2	2.0 ± 0.1	0.28 ± 0.04	-78 ± 5	1.9 ± 0.2	0.24 ± 0.08
$\Delta Y-2$	-31 ± 3	2.2 ± 0.2	0.30 ± 0.03	-71 ± 8	2.0 ± 0.2	0.23 ± 0.02
cZ	-36 ± 6	2.2 ± 0.2	0.55 ± 0.11	-60 ± 7	1.8 ± 0.2	5.07 ± 0.80

* Eine Expression der ΔX -Deletionsmutante konnte elektrophysiologisch nicht nachgewiesen werden.

Zeitkonstante τ_h mit ihrem Minimum. Als Minimum von τ_h wird der Minimalwert der τ_h -Kurve genommen, der bei hohen positiven Potentialen liegt. Da die Werte der τ_h -Kurve für Potential $>20\text{mV}$ nur eine sehr kleine Abweichung voneinander zeigen, ist dieser Wert eine ausreichend gute Näherung. Die Mutante ΔX wurde nicht exprimiert: das heißt, es wurde kein meßbarer Strom registriert.

5.3.2 Inaktivierungseffekt der cZ-Mutante

Wie man aus der Tabelle 5 entnehmen kann, werden die steady-state-

Parameter V_m und z_m bzw. V_h und z_h des Kanals durch die cZ-Deletionsmutation nicht beeinflusst. Aber τ_h der cZ-Mutante hat einen 10-fach größeren Wert als bei der Kontrolle.

Im Bild 33 a-d werden die Meßgrößen m_∞ , h_∞ , τ_m bzw. τ_h der cZ-Mutante im Vergleich zu den entsprechenden Größen der Wildtyp-Kontrolle graphisch dargestellt.

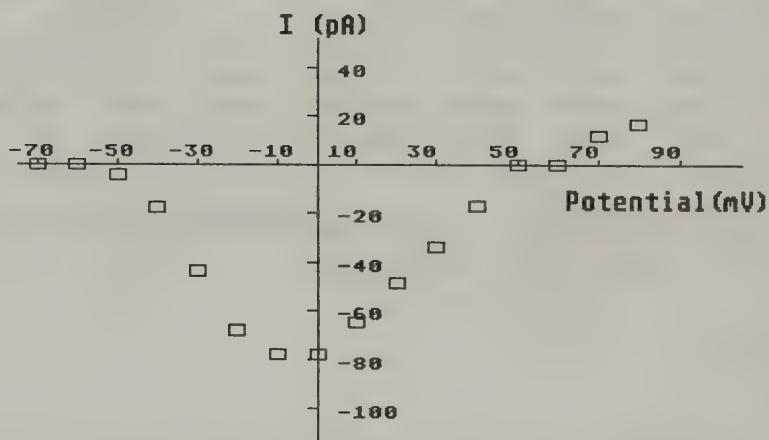


Bild 33 a) Strom-Spannungskurve der cZ-Mutante

Die gemessene Oozyte hat einen Maximalstrom von -70pA bei einem Potential von -10mV. Das Umkehrpotential hat einen Wert von 56mV.

Es ist eindeutig zu sehen, daß sich die Zeitkonstante der Inaktivierung durch den Schnitt zwischen Domäne III und IV geändert hat. Die cZ-Mutante hat ein 10-fach längeres τ_h als die Kontrolle, was eine langsamere Inaktivierung bedeutet.

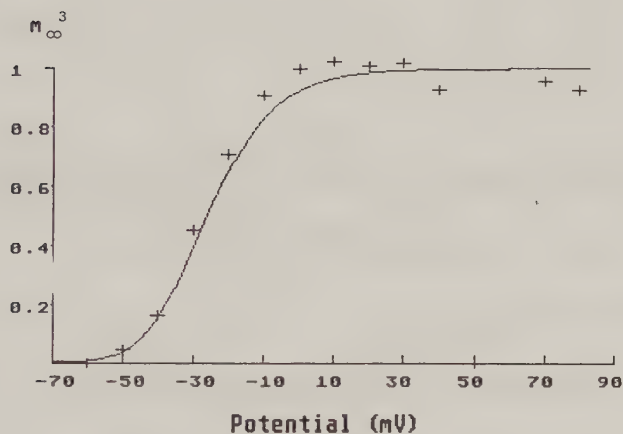


Bild 33 b) m_{∞}^3 - Kurve für cZ-Mutante und Kontrolle

Die Kontrolle wird durch eine durchgezogene Linie dargestellt mit:

$$V_m = -33 \text{ mV}, \quad z_m = 2.2.$$

Die cZ-Mutante wird mit Kreuz dargestellt mit:

$$V_m = -41.8 \text{ mV}, \quad z_m = 2.13$$

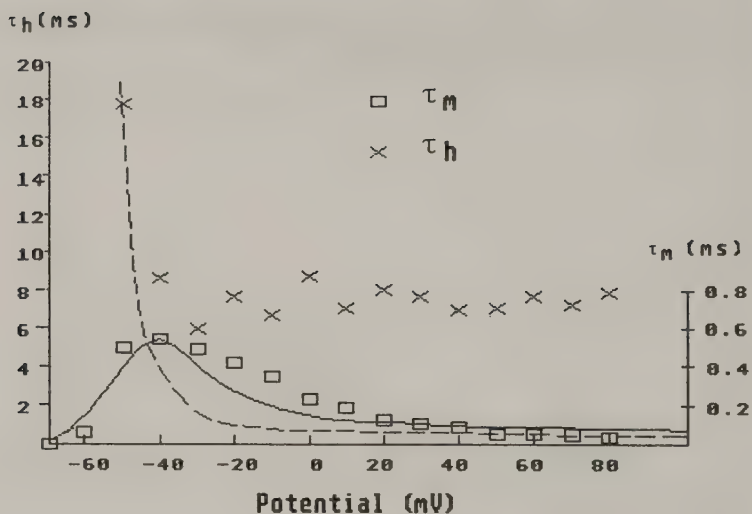
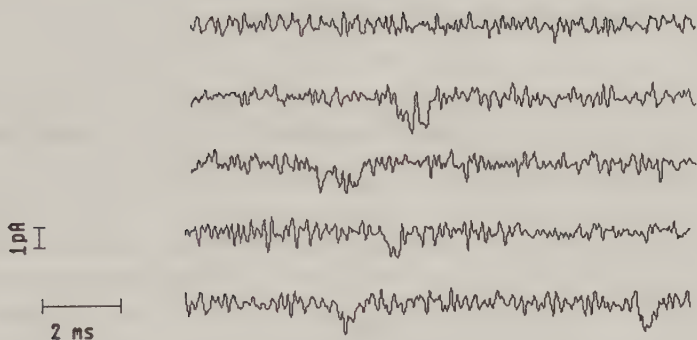


Bild 33 c) Die Zeitkonstanten der cZ-Mutante

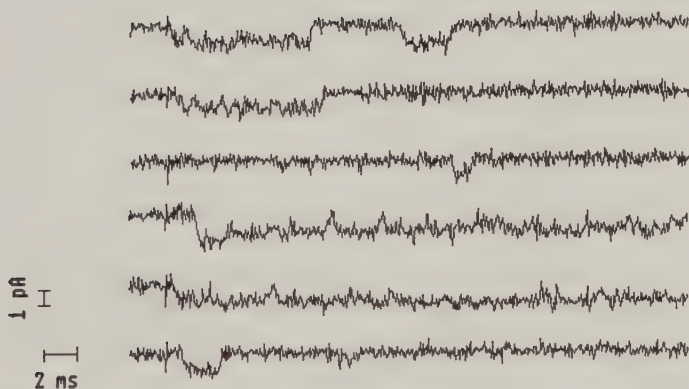
τ_m wird durch Quadrate und τ_h durch Kreuze dargestellt. Zum Vergleich wird die Kontrolle als durchgezogene Linie gezeigt.

Die Parameter für

cZ:	$\tau_{m,ma}$ = 0.62 ms bei -50 mV,
	$\tau_{h,min}$ = 5.95 ms
Kontrolle:	$\tau_{m,max}$ = 0.54 ms bei -40 mV,
	$\tau_{h,min}$ = 0.35 ms



Kontrolle



cZ-Mutante

Bild 34 Vergleich der Einzelkanalströme der cZ-Mutante und der Wildtyp-Kontrolle

Beide Ströme wurden bei einem Potential von -20 mV aufgenommen. Haltepotential = -120 mV . Filter: 2 kHz . Zu beachten ist die unterschiedliche Zeitskala.

5.3.3 Einzelkanalmessung der cZ-Mutante

In Bild 34 werden einige Spuren aus der Einzelkanalmessung für die cZ-Mutante gezeigt. Daneben sind zum Vergleich nochmals die entsprechenden Spuren bei den Kontrollloozyten zu sehen.

Die Einzelkanalströme der cZ-Mutante zeigen eindeutig längere Offenzeiten. In Bild 35 wird das Lebensdauerhistogramm der cZ-Mutante bei -10mV Testpotential gezeigt. Es resultiert eine Offenzeit $\tau = 40\text{ms}$, was dem 10-fachen der Kontrolle entspricht. Der Einzelkanalleitwert bleibt nahezu unverändert (Bild 36).



Bild 35 Lebensdauerhistogramm für die cZ-Mutante
Die Werte wurden aus insgesamt 140 Ereignissen ermittelt.

$$\tau_0 = 5.8 \text{ ms}$$

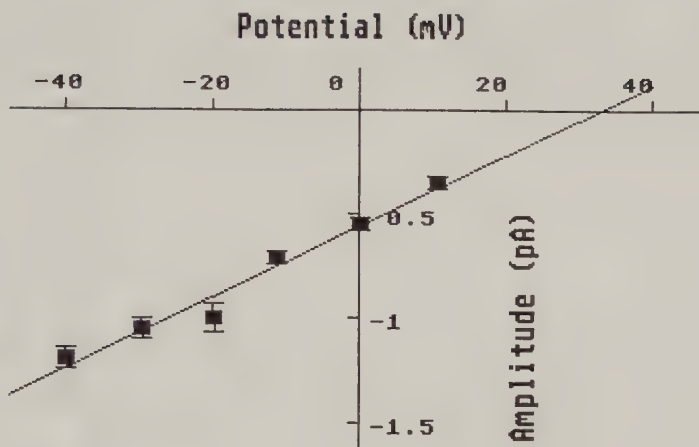


Bild 36 Einzelkanalleitwert für die cZ-Mutante

Es wurde zwischen -60mV und +10mV gemessen. Als Leitwert wurde aus den Amplitudenhistogrammen bei zwei Versuchen ein Mittelwert

von $\gamma = 17.3 \text{ pS}$

ermittelt.

5.3.4 Die Mutanten mit Deletion zwischen anderen Domänen

Die Mutante ΔX (Schnitt zwischen den Domänen I und II) wurde nicht exprimiert. In den Bildern 37 und 38 werden die Zeitkonstanten für die übrigen Deletionsmutanten dargestellt. Sie stimmen alle im Bereich des Meßfehlers mit den Werten der Wildtyp-Kontrolle überein.

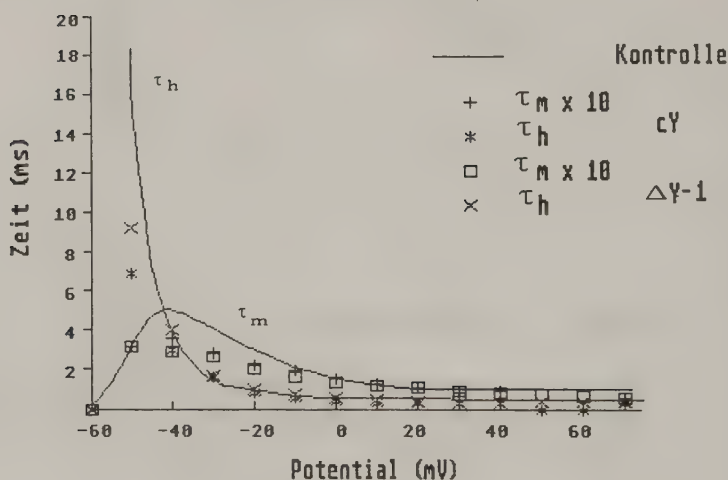


Bild 37 Vergleich der Mutanten cY und $\Delta Y-1$ mit der Kontrolle

Die Kontrolldaten werden mit durchgezogenen Linien dargestellt. Die Y-Mutanten werden mit verschiedenen Symbolen, die im Bild gekennzeichnet sind, dargestellt. Die jeweiligen τ_m -Werte werden 10-fach vergrößert dargestellt.

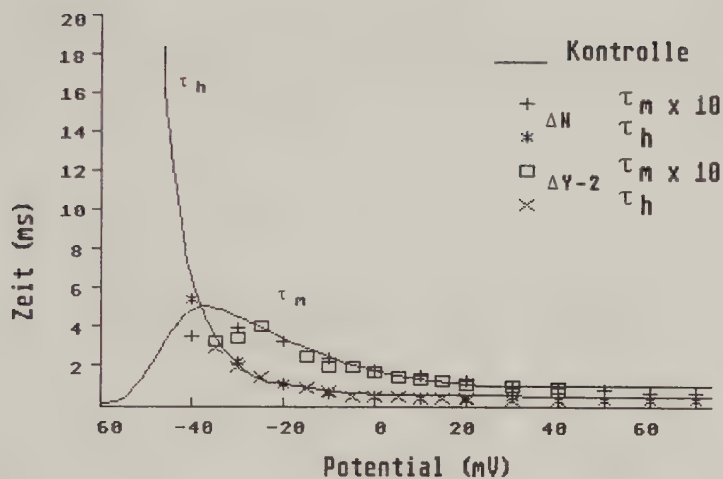


Bild 38 Vergleich der Mutanten ΔN und $\Delta Y-2$ mit der Wildtyp-Kontrolle.

Die Darstellungsform ist die gleiche wie in Bild 37.

5.3.5 Vielkanalfluktuationsanalyse

In der Tabelle 6 werden die Ergebnisse der Rauschanalyse für alle Deletionsmutanten zusammengefaßt. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem nativen Na⁺-Kanal.

Tabelle 6 Leitwerte der Deletionsmutanten

Mutante	Leitwert (Rauschanalyse)	Leitwert (Einzelkanalmessung)
Kontrolle	13.1 pS	19.0 pS
ΔC	12.3 pS	
ΔN	13.1 pS	
ΔX	--	
cY	11.3 pS	
ΔY-1	10.9 pS	
ΔY-2	13.4 pS	
cZ	11.7 pS	17.3 pS

6 Diskussion der Ergebnissen

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Expression mutierter mRNA des Na⁺-Kanals aus Rattenhirn in Oozyten des Frosches *Xenopus laevis* versucht, eine Relation zwischen einem Strukturmerkmal des Proteins und einer funktionellen Eigenschaft des Ionenkanals aufzuzeigen. Es wurden zwei Arten von Mutationen durchgeführt, zum einen Punktmutationen an den vier S4-Segmenten, durch die die Ladungen positiv geladener Aminosäuren neutralisiert wurden, zum anderen Deletionsmutationen, bei denen zwischen den verschiedenen Domänen geschnitten wurde. Da bisher keine direkten patch-clamp-Messungen am Na⁺-Kanal aus dem Rattenhirn vorgenommen werden konnten, wurde das Hodgkin-Huxley-Modell vom Riesenaxon des Tintenfisches benutzt, um die Na⁺-Ströme zu analysieren und die charakteristischen Parameter zu ermitteln. Die Messungen an den Mutanten wurden immer mit dem nativen Kanal verglichen.

Die Ergebnisse zeigen hauptsächlich zwei interessante Effekte: die Änderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Na⁺-Kanals durch die Punktmutation an den S4-Segmenten, bzw. die Verlangsamung der Inaktivierung durch die Deletionsmutation zwischen den Domänen III und IV.

6.1 Punktmutationen in den S4-Segmenten

6.1.1 Wirkung auf den Aktivierungsprozeß

Die S4-Segmente des Na⁺-Kanals fallen dadurch auf, daß sich an jeder dritten Stelle eine positiv geladene Aminosäure (Arginin oder Lysin) befindet. Eine ähnliche Struktur liegt auch beim spannungsabhängigen K⁺-Kanal (Baumann et al., 1987; Timpe et al., 1987; Tempel et al., 1987, 1988; Pongs et al., 1988) und dem spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanal (Tanabe et al., 1987) vor. Es

wurde angenommen, daß die S4-Segmente mit dem gating-Mechanismus in einem ursächlichen Zusammenhang stehen (Noda et al., 1984, 1986).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß durch Neutralisieren einzelner Ladungen im S4-Segment der Domänen I und II, insbesondere an den Positionen 226(Domäne I) und 862(Domäne II), die Charakteristik des Kanals bezüglich der Aktivierung eine deutliche Änderung erfährt. Es wird einerseits eine Verschiebung des Potentials V_m der Aktivierungskurve beobachtet. Andererseits verursacht die Neutralisierung der Ladungen eine Verringerung der Steigung der Aktivierungskurve. Dies entspricht nach dem Hodgkin-Huxley-Modell einer Erniedrigung der gating-Ladung. Für das S4-Segment der Domäne I konnte eine eindeutige Beziehung zwischen der Anzahl positiver Ladungen und der der gating-Ladungen beobachtet werden.

Außerdem wurden einige Mutanten untersucht, die gleichzeitig Mutationen an zwei verschiedenen Domänen enthielten. Es zeigt sich ein gewisser additiver Effekt bei den Domänen I und II.

6.1.2 Orientierung der S4-Segmente

Im Modell von Numa wird angenommen, daß die Segmente S1-S6 transmembrane Helixstrukturen bilden. Es fehlen aber direkte experimentelle Hinweise dazu, insbesondere beim S4-Segment. Da die S4-Segmente durch die positiven Ladungen eher hydrophil sind, herrscht eine große Unsicherheit über die Position und die Orientierung der S4-Segmente.

In unseren Experimenten beobachten wir, daß in der Domäne I das Eliminieren einer positiven Ladung bei den Positionen 223 und 226 eine Verschiebung des Aktivierungspotentials V_m zur positiven Seite um mehr als 10 mV verursacht. Dagegen bewirkt das Eliminieren einer positiven Ladung an den Positionen 217 und 220 eine Verschiebung des Aktivierungspotentials V_m in die entgegen-

gesetzte Richtung. Wenn wir uns das 'gate' als einen elektrischen Dipol in der Membran vorstellen, geben diese Ergebnisse einen Hinweis darauf, daß die S4-Segmente diese Dipole bilden könnten.

Aber selbst wenn die S4-Segmente keine Transmembranhelix bilden sollten, bleiben die Schlußfolgerungen gültig, daß mindestens einige Ladungen der S4-Segmente (am 226-Ende) den spannungsabhängigen Schalter bilden, weil die Eliminierung dieser Ladungen eine direkte Wirkung auf den Aktivierungsprozeß ausüben.

6.1.3 Die Äquivalenz der vier Domänen

Beim Riesenaxon des Tintenfisches haben Hodgkin und Huxley gefunden, daß der Aktivierungsprozeß durch m^3 beschrieben werden kann (Hodgkin und Huxley, 1952 c). Dies wurde an vielen Zellsystemen bestätigt. Es gab aber auch davon abweichende Ergebnisse bei anderen Zellen. Bei den Nervenfasern von *Xenopus laevis* zum Beispiel wurde beobachtet, daß die Aktivierung besser mit m^2 beschreibbar ist (Frankenhaeuser, 1960). Bei in Oozyten exprimierten Na^+ -Kanälen aus Rattenhirn wurde gezeigt, daß der m^3 -Fit besser ist als ein m^2 - oder m^4 -Fit (Stühmer et al., 1986). Da der Na^+ -Kanal aber aus vier homologen Domänen besteht, würde man aus Symmetriegründen eher m^4 statt m^3 erwarten. Das wirft die interessante Frage auf, ob die vier Domänen äquivalente Funktionen besitzen.

Aus unseren Ergebnissen kann man sehen, daß die Domänen I und II mit großer Sicherheit die gleiche Funktion haben. Bei der Domäne IV konnte keine Verschiebung von V_m in die positive Richtung beobachtet werden. Die Positionen 1629 und 1632 wurden nicht getestet. Aber es steht fest, daß sich die Ladungen der Positionen 1635, 1638, 1641, 1644 und 1647 nicht wie die Ladungen in der Domäne I am 226-Ende verhalten. Da die genauen Grenzen der S4-Segmente nicht bekannt sind, ist jedoch keine eindeutige Aussage möglich, ob die Domäne IV die gleiche Funktion wie

die Domänen I und II besitzt.

Interessant ist es auch, daß alle getesteten Mutanten in der Domäne IV eine negative Verschiebung des Halbwertspotentials für die steady-state-Inaktivierung V_h aufweisen. Dagegen zeigt V_h bei den Mutanten in den Domänen I und II keine signifikante Verschiebung gegenüber der Wildtyp-Kontrolle. Es wäre durchaus denkbar, daß das S4-Segment der Domäne IV eine Rolle bei der Inaktivierung spielt. Damit wäre auch zu erklären, daß der m^3 -Fit besser ist als der m^4 -Fit.

6.1.4 Die Einzelkanalleitwerte

Die Mutanten, die einen Effekt bei der Aktivierung aufzeigen, wurden mit Hilfe der Fluktuationsanalyse auf ihre Einzelkanalleitwerte untersucht. Es wurden keine signifikanten Änderungen bezüglich des Leitwertes beobachtet. Das bestätigt die Annahme, daß die S4-Segmente nicht die innere Wandung des Kanals bilden.

6.2 Die Deletionsmutanten

Bei mehreren Modellen wurde angenommen, daß die vier homologen Domänen, die die hydrophoben Transmembransegmente beinhalten, durch drei relativ lange hydrophile Regionen verbunden werden. Die hydrophilen Regionen sowie die N- und C-Termini liegen alle auf der zytoplasmatischen Seite der Membran (Noda et al., 1984, 1986; Greenblatt et al., 1985; Guy & Seecharamula, 1986).

6.2.1 Wirkung auf die Inaktivierung der cZ-Mutante

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß durch einen einfachen Schnitt zwischen den Domänen III und IV eine eindeutige Änderung bei der Inaktivierung des Na^+ -Kanals erzielt wurde. Die cZ-

Mutante zeigt gegenüber dem Wildtyp eine drastische Zunahme der Zeitkonstanten τ_h (etwa 10-fach so groß), während die Parameter für Aktivierung und das Halbwertspotential V_h für die steady-state-Inaktivierung keine Änderungen zeigen.

Um die cZ-Mutante genauer zu untersuchen, wurden direkte Einzelkanalmessungen durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß die cZ-Mutante eine mittlere Lebensdauer von 5.8 ms besitzt. Diese ist damit etwa 10 mal so lang wie die des Wildtyps (0.56 ms).

Diese drastische Veränderung der Inaktivierungszeit des makroskopischen Na^+ -Stroms und die Verlängerung der mittleren Lebensdauer bei der Einzelkanalmessung entsprechen den Ergebnissen vieler Messungen bei Zugabe bestimmter Substanzen zur intrazellulären Seite des nativen Na^+ -Kanals. Man hat z.B. gefunden, daß durch intrazelluläre Zugabe des proteolytischen Enzyms Pronase die Inaktivierung des Na^+ -Kanals in gleicher Weise verändert wird (Armstrong et al., 1973; Stimers et al., 1985).

Vor kurzem wurde von Catterall und Mitarbeitern in den USA ein weiterer Befund veröffentlicht (Vassilev et al., 1988). Es ist ihnen gelungen, durch Binden eines Antikörpers an dem Segment zwischen Domäne III und Domäne IV die Inaktivierung des Kanals teilweise zu verhindern. Demgegenüber zeigte das Binden entsprechender Antikörper an die Segmente zwischen den anderen Domänen keine Effekte.

6.2.2 Mutanten mit Deletion zwischen anderen Domänen

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Mutanten mit Schnitten zwischen den Domänen I und II, II und III bzw. Deletion an den N- und C-Termini untersucht. Im Gegensatz zur cZ-Mutante zeigten diese keine Änderungen im Schaltverhalten des Kanals.

Daraus kann man nun folgern, daß die Region zwischen den Domänen III und IV an der Inaktivierung des Na^+ -Kanals beteiligt ist.

6.2.3 Die Einzelkanalleitwerte

Die Deletionsmutanten zeigen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle auch keine signifikanten Veränderungen in den Einzelkanalleitwerten.

6.3 Über das Hodgkin-Huxley-Modell

Zur Analyse der experimentellen Daten wird in der vorliegenden Arbeit das Hodgkin-Huxley-Modell verwendet.

Die Forschung der letzten 10 Jahren hat jedoch gezeigt, daß das Hodgkin-Huxley-Modell einige Modifikationen benötigt, um den gating-Mechanismus des Na^+ -Kanals zu beschreiben.

Das zentrale Problem liegt hierbei im Inaktivierungsprozeß. Im Hodgkin-Huxley-Modell wurde angenommen, daß der Aktivierungs- und der Inaktivierungsprozeß voneinander unabhängig sind und jeweils eigenen Spannungsabhängigkeiten gehorchen. Aldrich et al. (1983) haben aber z.B. bei Neuroblastoma-Zellen beobachtet, daß der Inaktivierungsprozeß erst nach der Aktivierung beginnt und zwar mit einer konstanten, spannungsunabhängigen Rate. Obwohl noch kein allgemein gültiges Modell existiert, herrscht über den gating-Mechanismus die Meinung vor, daß Aktivierung und Inaktivierung ein gekoppeltes System darstellen (Gonoi und Hille, 1987).

Trotzdem bleibt das Hodgkin-Huxley-Modell sehr nützlich für diese Arbeit. Es ermöglicht, den kinetischen Prozeß des Na^+ -Kanals durch einige wenige Parameter zu beschreiben und damit den direkten Vergleich zwischen dem nativen und den mutierten Na^+ -Kanälen durchzuführen. Aber es muß bei der Interpretation der Ergebnisse darauf geachtet werden, daß besonders die Parameter für die Inaktivierung eine große Unsicherheit beinhalten können.

Unsere zwei Schlußfolgerungen, zum einen, daß eine Relation zwischen den Ladungen in den S4-Segmenten und der Spannungs-

abhängigkeit der Aktivierung des Kanals besteht, und zum anderen, daß die Region zwischen den Domänen III und IV eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung spielt, bleiben jedoch gültig. Bei den Mutationen in den S4-Segmenten haben wir eine direkte Veränderung des Aktivierungsprozesses beobachtet. Bei der cZ-Mutante wurde die Verlangsamung der Inaktivierung durch die direkte Einzelkanalmessung bestätigt.

6.4 Schlußfolgerung und Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wurden zwei Sequenzbereiche gefunden, die für zwei Kanalfunktionen charakteristisch sind. 1. Das S4-Segment bildet einen Teil des spannungsabhängigen Schalters, nämlich jenen für die Aktivierungssteuerung des Kanals. 2. Die Region zwischen den Domänen III und IV ist wichtig für die Inaktivierung des Kanals. Dies entspricht auch den meisten Modellvorstellungen über den Na⁺-Kanal.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Verbindung der patch-clamp-Technik mit der rekombinanten DNA-Technik einen erfolgversprechenden Weg aufzeigt, durch gezielte Mutationen am Kanalprotein Struktur-Funktionsbeziehungen bei Ionenkanälen zu untersuchen.

Diese Arbeit ist nur ein Anfang auf diesem Weg. Da der Na⁺-Kanal ein sehr großes Molekül ist, wird es sicher noch sehr lange dauern, bis seine Struktur und Funktion vollständig verstanden werden. Der Na⁺-Kanal besitzt neben dem gating-Mechanismus noch andere Eigenschaften wie Ionenselektivität und Blockademechanismus. Es ist vorstellbar, daß in näherer Zukunft die hier angewendeten Methoden auch zu deren Verständnis beitragen werden.

7 Zusammenfassung

Die Arbeit von Hodgkin und Huxley am Riesenaxon des Tintenfisches in den fünfziger Jahren haben zu einem genaueren Verständnis des Mechanismus der Erregbarkeit der Zellmembran geführt. Das Modell von Hodgkin und Huxley wurde danach an verschiedenen Systemen getestet und bestätigt. In der nachfolgenden Zeit wurde auch die voltage-clamp-Technik von Hodgkin und Huxley weiter entwickelt. 1976 erzielten dann Neher und Sakmann einen Durchbruch mit der patch-clamp-Technik. Die patch-clamp-Technik ermöglicht es, das Rauschen bei der voltage-clamp-Messung drastisch zu reduzieren, so daß die Aufnahme des Ionenstroms durch einen einzelnen Ionenkanal möglich wird.

Seit den siebziger Jahren ist man in der Lage, die Ionenkanäle, die sich als integrale Membranproteine herausstellten, zu identifizieren. Mit Hilfe der Molekularbiologie ist es gelungen, die Kanalproteine kodierende cDNA zu klonieren. Dadurch wurde ein neuer Weg für die Forschung an Ionenkanäle eröffnet. Man kann jetzt bestimmte Veränderungen am Gen des Proteins, damit an dessen Struktur, durchzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Veränderungen an der cDNA des Na^+ -Kanalproteins aus Rattenhirn (Typ II) vorgenommen. Danach wurde die in-vitro transkribierte mRNA in die Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* injiziert. Nach erfolgreicher Expression des Kanalproteins wurden die Oozyten unter Verwendung der patch-clamp-Technik vermessen.

Der Hauptteil der Messungen besteht aus den Aufnahmen der makroskopischen Na^+ -Ströme. Diese Ströme wurden dann im Rahmen des Hodgkin-Huxley-Modells analysiert, um die kinetischen Parameter zu ermitteln. Die Ergebnisse der Mutanten wurden mit denen des nativen Kanals verglichen, um mögliche Relationen zwischen der Struktur des Kanals und dessen Funktion zu erforschen. Bei der Wildtyp-Kontrolle bzw. einigen Mutanten wurden auch direkte Einzelkanalmessungen durchgeführt. Daraus wurden die Einzelkanalleitwerte und die mittlere Lebensdauer des Kanals (im offenen Zustand) bestimmt. Für alle Mutanten, die eine Änderung

in den "gating"-Eigenschaften gezeigt haben, wurden mit der Vielkanalfluktuationsanalyse die Einzelkanalleitwerte bestimmt, um mögliche Veränderungen bei der Leitfähigkeit des Kanals zu kontrollieren.

Die Ergebnisse zeigten aufgrund der Mutationen zwei interessante Effekte bei den Kanalfunktionen.

i) Durch Eliminieren einiger positiver Ladungen im S4-Segment bei den Domänen I und II wurde eine Verschiebung des Aktivierungspotentials und eine Verringerung der "gating"-Ladungen verursacht. Dies liefert den direkten Beweis dafür, daß die S4-Segmente mindestens einen Teil des 'gate' bilden. Bei der Domäne I wurde beobachtet, daß durch Neutralisation der positiven Ladungen am 226-Ende, das im Numa-Modell auf der cytoplasmatischen Seite der S4-Helix liegt, das Aktivierungspotential V_m um mehr als 10 mV zur positiven Richtung verschoben wurde. Die Mutation am entgegengesetzten 217-Ende bewirkte eine Verschiebung in die negative Richtung. Das unterstützt die Vorstellung, daß das 'gate' einen elektrischen Dipol darstellt, der mit dem positiven Pol zur inneren Seite der Membran orientiert ist. Außerdem konnte mit der gleichzeitigen Mutation in den Domänen I und II ein gewisser additiver Effekt nachgewiesen werden.

ii) Durch einen Schnitt in der Region zwischen den Domänen III und IV wurde die Inaktivierung verlangsamt. Es zeigte sich der gleiche Effekt wie bei vielen Experimenten mit verschiedenen chemischen Substanzen, die die Inaktivierung teilweise oder vollständig eliminieren. Die Einzelkanalmessungen bestätigten diese Ergebnisse. Die cZ-Mutante besitzt eine viel längere mittlere Lebensdauer (5.8 ms) als der Wildtyp (0.56 ms).

Dadurch sind zwei wichtige Regionen des Na⁺-Kanalproteins identifiziert. Zum einen sind die S4-Segmente für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zuständig, und zum anderen spielen die Verbindungen zwischen den Domänen III und IV eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Kombination von Gentechnik und Elektrophysiologie einen erfolversprechenden Weg darstellt, um zu einem detaillierten molekularen Verständnis der Funktionsweise von Ionenkanälen zu gelangen.

Literaturverzeichnis

- Agnew, W. S.** (1984)
Voltage-regulated sodium channel molecules
Ann. Rev. Physiol. 46 : 517-530
- Aldrich, R.W., Corey, D.P., Stevens, C.F.** (1983)
A reinterpretation of mammalian sodium channel gating
based on single channel recording
Nature 306 : 436-441
- Armstrong, C. M., Bezanilla, F., Rojas, E.** (1973)
Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons
perfused with pronase
J. Gen. Physiol. 62 : 375-391
- Armstrong, C. M., Bezanilla, F.** (1973)
Currents related to movement of the gating particles
of the sodium channels
Nature 242 : 459-461
- Armstrong, C. M., Bezanilla, F.** (1974)
Charge movement associated with the opening and closing
of the activation gates of the Na channels
J. Gen. Physiol. 63 : 533-552
- Baumann, A., Krah-Jentgens, Müller, R.,
Müller-Holtkamp, F., Seidel, R., Casal, J., Ferrus, A.,
Pongs, O.** (1987)
Molecular organization of the maternal effect region of the
Shaker complex of *Drosophila*: characterization of an I_A channel
transcript with homology to vertebrate Na^+ channel
EMBO J. 6 : 3419-3429

- Casadei, J. M., Gordon, R. D., Lampson, L. A., (1984)
Schotland, D. L., Barchi, R. L.
Monoclonal antibodies against the voltage-sensitive Na⁺-
channel from mammalian skeletal muscle
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 6227-6231
- Catterall, W. A. (1980)
Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels
in excitable membranes
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20 : 15-43
- Catterall, W. A. (1982)
The emerging molecular view of the sodium channel
TINS 5 : 303-306
- Catterall, W. A. (1984)
The molecular basis of neuronal excitability
Science 223 : 653-660
- Frankenhaeuser, B. (1960)
Quantitative description of sodium currents in myelinated
nerve fibres of *Xenopus laevis*
J. Physiol. 151 : 491-501
- French, R. J., Horn, R. (1983)
Sodium channel gating: Models, mimics, and modifiers
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 12 : 319-356
- Goldin, A. L., Snutch, T., Lübbert, H., Dowsett, A., (1986)
Marshall, J., Auld, V., Downey, W., Fritz, L. C., Lester,
H.A. Dunn, R., Catterall, W. A., Davidson, N.
Messenger RNA coding for only the α subunit of the rat brain
Na channel is sufficient for expression of functional channels in
Xenopus oocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 7503-7507

- Goldman, D.E.** (1943)
Potential, Impedance, and Rectification in Membranes
J. Gen. Physiol. 27 : 37-60
- Gonoi, T., Hille, B.** (1987)
Gating of Na channels: Inactivation modifiers discriminate among models
J. Gen. Physiol. 89 : 253-274
- Greenblatt, R.E., Blatt, Y., Montal, M.** (1985)
The structure of the voltage-sensitive sodium channel
FEBS Lett. 193 : 125-134
- Guy, H.R., Seetharamulu, P.** (1986)
Molecular model of the action potential sodium channel
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 508-512
- Hagiwara, S., Saito, N.** (1959)
Voltage-current relations in nerve cell membrane of *Onchidium verruculatum*
J. Physiol. 148 : 161-179
- Hamill, O.P., Sakmann, B.** (1981)
Multiple Conductance State of single Acetylcholine Receptor Channels in embryonic Muscle Cells
Nature 294 : 462-464
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J.** (1981)
Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches
Pflügers Arch. 391 : 85-100

Hanke, W., Boheim, G., Barhanin, J., Pauron, D., (1984)
Lazdunski, M.

Reconstitution of highly purified saxitoxin-sensitive Na^{+} -
channels into planar lipid bilayers

EMBO J. 3 : 509-515

Hartshorne, R. P., Catterall, W. A. (1984)

The sodium channel from rat brain: Purification and subunit
composition

J. Biol. Chem. 259 : 1667-1675

Hartshorne, R. P., Keller, B. U., (1985)

Talvenheimo, J. A., Catterall, W. A., Montal, M.

Functional reconstitution of the purified brain sodium channel
in planar lipid bilayers

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 240-244

Hille, B. (1967)

The selective inhibition of delayed potassium currents in
nerve by tetraethylammonium ion

J. Gen. Physiol. 50 : 1287-1302

Hodgkin, A. L., Katz, B. (1949)

The Effect of Sodium Ions on the Electrical Activity
of the Giant Axon of the Squid

J. Physiol. 108 : 37-77

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., Katz, B. (1952)

Measurement of current-voltage relations in the membrane
of the giant axon of *Loligo*

J. Physiol. 116 : 424-448

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952a)

Currents carried by sodium and potassium ions through the
membrane of the giant axon of *Loligo*

J. Physiol. 116 : 449-472

- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952b)
The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*
J. Physiol. 116 : 473-496
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952c)
The dual effect of membrane potential on sodium conductance
in the giant axon of *Loligo*
J. Physiol. 116 : 497-506
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952d)
A quantitative description of membrane current and its
application to conduction and excitation in nerve
J. Physiol. 117 : 500-544
- Horn, R., Patlak, J. (1980)
Single Channel Currents from Excised Patches of Muscle Membrane
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 6930-6934
- Kayano, T., Noda, M., Flockerzi, V., (1988)
Takahashi, H., Numa, S.
Primary structure of rat brain sodium channel III deduced
from the cDNA sequence
FEBS Lett. 228 : 187-194
- Kao, C. Y., Nishiyama, A. (1965)
Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems
J. Physiol. 180 : 50-66
- Keller, B. U., Hartshorne, R. P., (1986)
Talvenheimo, J. A., Catterall, W. A., Montal, M.
Sodium channels in planar lipid bilayers: Channel gating
kinetics of purified sodium channels modified by batrachotoxin
J. Gen. Physiol. 88 : 1-23

Keynes, R. D., Rojas, E. (1973)

Characteristics of the sodium gating current in the squid giant axon
J. Physiol. Lond. 233 : 28P-30P

Keynes, R. D., Rojas, E. (1974)

Kinetics and steady-state properties of the charged system
controlling sodium conductance in the squid giant axon
J. Physiol. 239 : 393-434

Keynes, R. D. (1983)

Voltage-gated ion channels in the nerve membrane
Proc. R. Soc. Lond. B 220 : 1-30

Lombet, A., Lazdunski, M. (1984)

Characterization, solubilization, affinity labeling and
purification of the cardiac Na⁺ channel using Tityus toxin γ
Eur. J. Biochem. 141 : 651-660

Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., (1986)
Mishina, M., Numa, S., Sakmann, B.

Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes:
currents through endogenous channels and implanted
acetylcholine receptor and sodium channels
Pflügers Arch. 407 : 577-588

Miller, J. A., Agnew, W. S., Levinson, S. R. (1983)

Principal glycopeptide of the tetrodotoxin/saxitoxin binding
protein from *Electrophorus electricus*: Isolation and partial
chemical and physical characterization
Biochemistry 22 : 462-470

Nakamura, Y., Nakajima, S., Grundfest, H. (1965)

The action of tetrodotoxin on electrogenic components of
squid giant axons
J. Gen. Physiol. 48 : 985-996

- Narahashi, T., Moore, J. W., Scott, W. R.** (1964)
Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in
Lobster giant axons
J. Gen. Physiol. 47 : 965-974
- Neher, E.** (1974)
Elektronische Meßtechnik in der Physiologie
Springer- Verlag , Berlin
- Neher, E., Sakmann, B.** (1976)
Single-Channel Currents recorded from Membrane of
Denervated Frog Muscle Fibers
Nature 260 : 798-802
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T.,** (1984)
Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H.,
Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H.,
Raftery, M. A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H.,
Miyata, T., Numa, S.
Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel
deduced from cDNA sequence
Nature 312 : 121-127
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H.,** (1986)
Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H., Numa, S.
Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain
Nature 320 : 188-192
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R.,** (1988)
Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H.H., Canal, I.,
Llamazares, S., Ferrus, A.
Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins
in the nervous system of *Drosophila*
EMBO J. 7 : 1087-1096

Rosenberg, R. L., Tomiko, S. A., Agnew, W. S. (1984a)

Reconstitution of neurotoxin-modulated ion transport by the voltage-regulated sodium channel isolated from the electroplax of *Electrophorus electricus*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1239-1243

Rosenberg, R. L., Tomiko, S. A., Agnew, W. S. (1984b)

Single-channel properties of the reconstituted voltage-regulated Na channel isolated from the electroplax of *Electrophorus electricus*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 5594-5598

Sakmann, B., Neher, E. (1983)

Single-Channel Recording

Plenum Press, New York

Sakmann, B., Neher, E. (1984)

Patch clamp technique for studying ionic channels in excitable membranes

Ann. Rev. Physiol. 46 : 455-472

Salkoff, L., Butler, A., Wei, A., Scavarda, N., (1987)

Giffen, K., Ifune, C., Goodman, R., Mandel, G.

Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*

Science 237 : 744-749

Schmidt, A., Schmidt, O. (1974)

Effect of aconitine on the sodium permeability of the node of Ranvier

Pflügers Arch. 349 : 133-148

Sigworth, F.J. (1980)

The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier

J. Physiol. 307 : 97-129

- Sigworth, F.J., Neher, E.** (1980)
Single Na⁺-Channel Currents Observed in Cultured Rat Muscle Cells
Nature 287 : 447-449
- Stimers, J.R., Bezanilla, F., Taylor, R.E.** (1985)
Sodium Channel Activation in the Squid Giant Axon
J. Gen. Physiol. 85 : 65-82
- Stühmer, W., Methfessel, C., Sakmann, B., Noda, M., Numa, S.** (1987)
Patch clamp characterization of sodium channels expressed from rat brain cDNA
Eur. Biophys. J. 14 : 131-138
- Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J. S., Richards, B. M., Barnard, E. A.** (1981)
Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes
Nature 292 : 862-864
- Suzuki, H., Beckh, S., Kubo, H., Yahagi, N., Ishida, H., Kayano, T., Noda, M., Numa, S.** (1988)
Funktionale expression of cloned cDNA encoding sodium channel III
FEBS Lett. 228 : 195-200
- Talvenheimo, J. A., Tamkun, M. M., Catterall, W. A.** (1982)
Reconstitution of neurotoxin-stimulated sodium transport by the voltage-sensitive sodium channel purified from rat brain
J. Biol. Chem. 257 : 11868-11871
- Tamkun, M. M., Talvenheimo, J. A., Catterall, W. A.** (1984)
The sodium channel from rat brain: Reconstitution of neurotoxin-activated ion flux and scorpion toxin binding from purified components
J. Biol. Chem. 259 : 1676-1688

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., (1987)
Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M.,
Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S.

Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle

Nature 328 : 313-318

Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., (1987)
Jan, Y.N., Jan, L.Y.

Sequence of a Probable Potassium Channel Component Encoded at Shaker Locus of *Drosophila*

Science 237 : 770-775

Tempel, B.L., Jan, Y.N., Jan, L.Y (1988)

Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain

Nature 332 : 837-839

Timpe, J.C., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., (1988)
Papazian, D.M., Jan, Y.N., Jan, L.Y.

Expression of functional potassium channels from shaker cDNA in *Xenopus* oocytes

Nature 331 : 143-145

Ulbricht, W. (1969)

The Effect of Veratridine on Excitable Membranes of Nerve and Muscle

Ergeb. Physiol. 61 : 18-71

Vassilev, P.M., Scheuer, T., Catterall, W.A. (1988)

Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation

Science 241 : 1658-1661

Weigle, J. B., Barchi, R. L.

(1982)

Functional reconstitution of the purified sodium channel
protein from rat sarcolemma

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 3651-3655

Lebenslauf

Xiaodong Wang

Geboren: am 30. Mai 1960 in der Stadt Shanghai,
Volksrepublik China

Eltern: Luxin Lu, Beamter
Juechu Wang, Lehrerin

Ausbildung:

1967 -1974 Besuch der Grundschule in Shanghai

1974-1977 Besuch der Mittelschule in Shanghai

1978-1979 Beginn mit dem Studium an der
Universität für Wissenschaft und Technik
in Hefei, China, Fachbereich Physik

1979-1980 Besuch des Deutsch-Kurses beim 'Kolleg
Shanghai' an der Tungji Universität

1980-1986 Seit WS 1980/81 Physikstudium an der
Gesamthochschule Wuppertal, BRD

Physik-Diplom Mai 1986
Diplomarbeit bei priv. Doz. Dr. W. Hoffmann
Thema: "Thermolumineszenz Dosimetrie in
Hoch-LET Strahlenfeldern"

seit Juni 1986 Stipendiat und Mitarbeiter in der Abteilung
Zellphysiologie von Prof. Dr. B. Sakmann,
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,
Göttingen

Seit Juni 1988 verheiratet mit der Diplom-
Physikerin Ge Zhang aus Shanghai

Xiaodong Wang
Baumschulenweg 5
3400 Göttingen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Boheim danke ich herzlich für hilfreiche Diskussionen zur Erstellung dieser extern angefertigten Arbeit und für die Übernahme des Referats für die Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

Mein besonderer Dank gilt den Herren Prof. Dr. B. Sakmann und Prof. Dr. E. Neher für die freundliche Aufnahme in ihren Abteilungen am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen und vielseitige Hilfeleistungen.

Herrn Dr. W. Stühmer danke ich für die Einführung in die patch-clamp Technik, die Anleitung und Hilfe bei den Experimenten. Herrn Dr. Ch. Methfessel danke ich für die Einführung in die Arbeit mit der mRNA und die Mikroinjektion.

Herrn Prof. Dr. S. Numa, Department of Medical Chemistry, Kyoto University, Japan gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung der mRNA Proben.

Herrn Prof. Dr. F. Conti gilt mein Dank für die Hilfe bei der Analyse der Daten und die Bereitstellung der Programme.

Bei den Kollegen Dr. H. Suzuki und Herrn M. Pusch möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken.

Herrn P. Stern, Herrn J. Ströttchen und Herrn E. Kühnle danke ich für die sprachliche Korrektur des Manuskriptes.

